



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

DIPARTIMENTO SCIENZE AGRARIE E FORESTALI
Dottorato di Ricerca in “ Sistemi Arborei Agrari e Forestali”

**INDAGINE SULLA DIVERSITÀ INTRA-VARIETALE
NELLE PRINCIPALI CULTIVAR DI OLIVO
(*Olea europaea* L.) SICILIANE**

SETTORE SCIENTIFICO DISCIPLINARE AGR /03

TESI DI
DOTT.SSA MARIALUISA DE SIMONE

TUTOR
CHIAR.MO PROF. TIZIANO CARUSO

COORDINATORE DEL DOTTORATO
CHIAR.MO PROF. TIZIANO CARUSO

XXIV CICLO 2011-2013

INDICE

I. INTRODUZIONE	3
1. Importanza della biodiversità in agricoltura	3
2. La variabilità genetica nell'olivo	6
3. Recupero, conservazione e caratterizzazione del germoplasma	9
4. Caratterizzazione morfologica	11
5. Caratterizzazione molecolare	13
6. Panorama varietale dell'olivo nel bacino del Mediterraneo	16
7. L'olivo in Italia	19
8. La banca mondiale del germoplasma dell'olivo	20
9. Il germoplasma dell'olivo in Sicilia	22
10. Importanza della certificazione del materiale vivaistico: aspetti tecnici	26
II. OBIETTIVO DELLA RICERCA	30
III. MATERIALI E METODI	32
1. Materiale vegetale	32
2. Caratterizzazione morfologica	34
3. Caratterizzazione molecolare	38
IV. RISULTATI E DISCUSSIONE	41
1. Caratterizzazione morfologica	41
V. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE	68
VI BIBLIOGRAFIA	69
APPENDICI	83

I. INTRODUZIONE

1. Importanza della biodiversità in agricoltura

La biodiversità è costituita dall'insieme di tutte le forme viventi geneticamente diverse e degli ecosistemi ad esse correlati, implicando tutta la variabilità biologica di geni, specie, habitat ed ecosistemi che esistono in un determinato territorio.

Per poter definire il grado di diversità delle forme di vita terrestri bisogna tener conto delle interazioni reciproche e ambientali all'interno dei gruppi geneticamente omogenei (specie) e della varietà interna. Nell'ambito della biodiversità si individuano tre diversi livelli: la diversità a livello dei geni in una specie (genetica o intraspecifica), la diversità a livello di specie (specificata o interspecifica) e la diversità a livello di ecosistema (ecosistemica) (Redford e Richter 1999). La diversità genetica, pur essendo il livello più basso nella gerarchia della biodiversità, è di fondamentale importanza in quanto caratterizza il potenziale ecologico ed evolutivo delle specie ed esercita un forte impatto sui livelli gerarchici superiori (Templeton et al., 2001).

La variabilità genetica all'interno degli individui di una determinata specie è legata al verificarsi di incroci tra individui con caratteri diversi che permettono lo sviluppo di patrimoni genetici unici, riflesso dell'adattamento alle condizioni ambientali del momento. Popolazioni sufficientemente ampie e non isolate sono, inoltre, ideali per lo sviluppo di tale variabilità.

L'agrobiodiversità rappresenta una parte della biodiversità, intesa come insieme di varietà e razze locali di interesse agricolo, forestale e zootecnico. La predominanza di poche specie selezionate dall'uomo in base alle ricercate caratteristiche qualitative e in particolare in base al loro elevato grado di rendimento, di fatto determina la perdita di biodiversità negli ecosistemi agricoli. Se da un lato, questo aspetto può avere conseguenze negative, che come vedremo si ripercuotono su tutto il contesto tecnico-economico del settore produttivo, dall'altro non bisogna sottovalutare le esigenze colturali di un'agricoltura moderna e di precisione. Le varietà ad alta resa, oggi hanno soppiantato le numerosissime varietà locali presenti in diversi territori, determinando un impoverimento della base genetica, una drastica riduzione delle razze/cultivar allevate per ogni singola specie e un forte calo della variabilità genetica entro le popolazioni.

In Europa solo 150 specie vegetali sono coltivate, 12 delle quali forniscono approssimativamente il 75% della nostra alimentazione e 4 di esse producono più della metà degli alimenti che vengono consumati dalla popolazione umana

(<http://www.fao.org/biodiversity>).

L'introduzione di nuove varietà ad alta resa, allo stesso tempo, ha portato allo sviluppo di colture geneticamente uniformi, più suscettibili nei confronti delle avversità biotiche e abiotiche. D'altra parte, la gestione colturale di un impianto geneticamente non uniforme comporta una maggiore difficoltà, ed in alcuni casi l'impossibilità, di gestire la coltura in modo mirato e di ottenere produzioni che rispondano nel tempo e nello spazio a standard qualitativi prefissati.

Oggi l'agricoltura moderna tende ad ottimizzare le pratiche colturali orientandosi verso un'agricoltura di precisione o "sito-specifica", che consiste nel rendere il sistema agricolo produttivo, redditizio, ecocompatibile e tecnologicamente avanzato, ricorrendo a macchine operatrici dotate di "sistemi intelligenti", in grado di dosare i fattori produttivi (fertilizzanti, antiparassitari) in relazione alle reali necessità dell'appezzamento e alle diverse zone omogenee interne ad esso (Verhagen e Bouma, 1997). Nella normale pratica agricola, gli interventi vengono basati sulle caratteristiche medie del suolo e ciò implica che, in funzione delle intrinseche variabilità spaziali dentro il campo, l'applicazione dei fattori produttivi potrà essere insufficiente o eccedentaria. L'agricoltura di precisione, al contrario, mira ad adattare gli apporti puntiformi, tenendo conto della variabilità locale delle caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche del campo, nonché della tempistica di applicazione (Pierce e Sadler, 1997). Tale modello di gestione può essere finalizzata a tre scopi principali: 1) incrementare le rese a parità di input complessivi; 2) ridurre gli input a parità di resa; 3) incrementare le rese riducendo nel contempo gli input (Robert et al., 1993). L'agricoltura di precisione dovrebbe basarsi su principi di ecologia, di genetica vegetale, sull'applicazione di apparecchiature e sensori alle piante e al suolo, e tenere conto delle loro interazioni.

In Italia, per le colture arboree l'agricoltura di precisione è ancora in fase di definizione e solo per la vite sono stati ottenuti già risultati di eccellenza (Brancadoro et al. 2006). La tutela della biodiversità nel settore agricolo deve dunque rispondere all'esigenza, fortemente sentita negli ultimi anni, di conciliare un'agricoltura produttiva con la tutela degli ecosistemi, mantenendo la complessità e la ricchezza genetica delle specie agricole. Le popolazioni costituite e affermatesi in specifici ambienti sono sotto il profilo ecologico, dotate di un notevole adattamento a condizioni pedoclimatiche anche difficili, grazie alla spinta selettiva che l'ambiente ha esercitato su di esse. Le varietà locali, dunque, rappresentano un patrimonio genetico da preservare che deve costituire la base sulla quale ricercare in seguito, caratteristiche di produttività e qualitative

rispondenti alle esigenze di mercato.

La tutela della biodiversità, indispensabile come punto di partenza per la costituzione di nuove varietà e per il miglioramento delle esistenti, può essere perseguita anche tramite la valorizzazione e l'utilizzo delle varietà locali, dalla quale tradizionalmente si ricavano prodotti tipici, espressione di genuinità e salubrità. Il loro recupero oltre a garantire la possibilità di diversificazione delle produzioni rafforza il legame con il territorio e, al contempo, promuove le specificità e i valori della biodiversità e in particolare della agrobiodiversità, aspetti della identità ambientale, culturale ed economica di un territorio.

Per salvaguardare la diversità biologica sono stati stipulati diversi accordi internazionali: dalla convenzione sulla biodiversità, firmata a Rio De Janeiro il 5 giugno del 1992, al Trattato Internazionale sulle risorse fitogenetiche per l'alimentazione e l'agricoltura, negoziato sotto l'auspicio della FAO e reso esecutivo nel 2004. In ambito europeo è stata adottata la direttiva 92/43/CE, nonché la strategia europea 2008-2014 per la conservazione delle piante.

Purtroppo l'Italia risulta carente di una legge organica che regoli il settore; proprio per supplire a tale carenza, la XIII Commissione Agricoltura ha dedicato nel corso della XVI Legislatura particolare attenzione al tema, esaminando in Comitato ristretto le proposte di legge presentate (C.2744, C.4309 e C.3780), arrivando all'approvazione di tre testi unificati

L'ultimo testo unificato, approvato dalla Commissione Agricoltura nella seduta del 16 maggio 2012 prevede novità importanti per la salvaguardia e la tutela del patrimonio autoctono attraverso l'istituzione di un sistema di conservazione della biodiversità agraria articolato in:

- un'anagrafe unica della biodiversità agraria per monitorare lo stato di conservazione;
- una rete di conservazione e sicurezza formata dai centri di conservazione *ex situ* e dagli agricoltori custodi;
- repertori regionali delle varietà e delle razze locali e registri regionali delle specie vegetali spontanee e autoctone. Per le varietà e le razze locali, si prevede la loro caratterizzazione genetica e/o fenotipica, iscrizione nel repertorio regionale, con conservazione e valorizzazione della varietà, presso le aziende o centri specifici di conservazione (*in situ*) o presso le banche dati del germoplasma (*ex situ*).

Le azioni generali per la tutela della biodiversità agraria sono: individuazione e recupero delle risorse genetiche vegetali a rischio di estinzione, loro caratterizzazione,

conservazione e uso sostenibile; scambio e condivisione delle risorse genetiche vegetali. (<http://leg16.camera.it/522?tema=261&Salvaguardia+della+biodiversit%C3%A0+in+agricoltura>).

Negli ultimi anni è aumentata in tutto il mondo la consapevolezza che la perdita delle risorse genetiche non rappresenta di “per sé” solo la scomparsa di materiale genetico indispensabile per la sopravvivenza di tutte le specie, ma anche la scomparsa di informazioni legate alle colture tipiche e tradizionali, associate ai saperi ed ai sapori locali, che rappresentano la più importante ricchezza di un Paese.

2. La variabilità genetica nell'olivo

L'olivo appartiene alla famiglia delle Oleaceae e, in rapporto al modello di classificazione, comprendente 20-29 specie. (Flahault, 1886; Morettini, 1972).

Il genere più importante, sia per il grado di diffusione che per l'interesse agricolo, è sicuramente il genere *Olea* e, in particolare, la specie *Olea europaea* L. La grande variabilità di tale specie e approfondite indagini citogenetiche lasciano supporre che sia una specie allopoliploide (Acevedo Coutinho, 1956), cioè originata da incrocio e successiva duplicazione tra due distinte specie del genere *Olea* aventi, rispettivamente, 11 e 12 cromosomi di base (per l'olivo $2n=46$).

In letteratura, tuttavia, non esiste un pensiero unanime circa le specie coinvolte nella comparsa di *Olea europaea* L. e circa il centro geografico nel quale essa si sia inizialmente differenziata e successivamente diffusa negli attuali areali di coltivazione.

Ciferri (1942) e Vavilov (1951) considerano l'olivo affine a *Olea chrysophylla* Lam., *Olea europaea laperrini* e a *Olea europaea cuspidata*. Chevalier (1948) include come possibili antenati le specie: *Olea chrysophylla* Lam., diffusa nell'Africa tropicale, in Arabia e in Madagascar; *Olea verrucosa* Link., localizzata nell'Africa australe; *Olea ferruginea* Royle (sin. *Olea cuspidata* Wall.) presente in India, Afghanistan e Nepal; *Olea somaliensis* Baker e *Olea laperrinei* Batt. e Trab. proveniente dal Marocco.

Negli ultimi anni, infine, studi molecolari hanno permesso di semplificare la classificazione tassonomica all'interno del genere *Olea* attraverso l'inclusione di più specie in una (Green e Wickens 1989; Lavee et al., 1996) e spiegando parzialmente le relazioni di parentela stabilite in precedenza.

Secondo il criterio tassonomico più diffusamente accettato dagli studiosi di sistematica

vegetale l'olivo (*Olea europaea* L.) consta di due varietà botaniche: una per l'oleastro (*Olea europaea* ssp. *europaea* var. *sylvestris*) e una per l'olivo coltivato (*O. europaea* ssp. *europaea* var. *europaea*) originatosi dalla forma silvestre in seguito alla selezione effettuata dall'uomo (Green e Wickens, 1989).

L'oleastro, forma ancestrale da cui deriverebbe l'olivo coltivato, dovrebbe essere indigeno non solo dell'Asia Minore ma di tutte le coste del Mediterraneo (Caruso, 1882; Pecori, 1891; Francolini, 1923).

I Greci per primi iniziarono la coltivazione e l'esportazione negli altri paesi del Mediterraneo (Zohary e Spiegel-Roy, 1975; Lavee, 1996; Angiolillo et al., 1999).

I ritrovamenti archeologici confermano l'ipotesi di una prima domesticazione nel Vicino Oriente, e della successiva diffusione, in direzione est-ovest, della coltivazione dell'olivo nel bacino del Mediterraneo (Zohari et al., 1994). Tuttavia, studi molecolari basati sulle similarità di RAPD tra varietà coltivate e selvatiche di *Olea europaea* L. e tra i differenti genotipi allevati nel bacino del Mediterraneo non chiariscono completamente quanto detto sopra (Besnard et al., 2001). Altri studiosi suggeriscono, infatti, che il primo centro di origine e diffusione dell'olivo possa essere collocato nel Mediterraneo Occidentale (in Spagna durante l'età del bronzo) dove popolazioni locali avrebbero per prime addomesticato l'olivo e contribuito all'espansione di questo nelle aree limitrofe (Terral e Simard, 1996). La teoria più accettata è comunque quella che l'olivo abbia come centro di origine il Medio Oriente (Zohary e Hopf, 1994).

Molto verosimilmente si può ipotizzare che in una prima fase di addomesticazione delle piante, si sia fatto uso di semi provenienti da alberi di oleastro selezionati in funzione di specifiche caratteristiche del frutto (dimensioni), così come avveniva con la semina di piante erbacee.

Indicativi in tal senso sono i ritrovamenti nei giacimenti di Teleilat Ghassul (3500-3700 a.C.) di endocarpi di olive sensibilmente più grandi di quelli dell'ancestrale oleastro.

Molteplici sono i fenomeni che hanno portato una così grande variabilità genetica: innanzitutto, l'olivo è una specie prevalentemente allogama con un elevato grado di etero-impollinazione che conduce a elevati livelli di eterozigosi e polimorfismo del DNA (Angiolillo et al., 1999; Rallo et al., 2000). Nel corso dei millenni, dunque, si sono originate, per incrocio spontaneo e successiva disseminazione naturale dei noccioli, nuove cultivar che, qualora apprezzate dall'uomo, sono state fissate per via vegetativa, tecnica che consente di stabilizzare i caratteri fenotipici selezionati.

Il reiterarsi di questo ciclo "selezione-moltiplicazione-incrocio-selezione" sembrerebbe

essere la principale ragione del progressivo aumento delle variabilità genetica dell'olivo. Quasi tutti gli autori che si sono occupati dell'origine dell'olivo e della sua variabilità intraspecifica concordano sul fatto che le moderne cultivar diffuse nelle aree olivicole sono il frutto di processi di selezione e differenziazione *in loco* (Besnard et al., 2000).

La longevità di questa pianta e la selezione di un gran numero di varietà hanno poi contribuito alla conservazione della sua variabilità e hanno permesso di tramandare una quota consistente di questa diversità genetica (Rallo et al., 2000). Inoltre, la diffusione della specie è stata possibile grazie alla facilità di moltiplicazione per ovulo, pollone, grossa talea di branca e innesto, tutte tecniche di uso antico e tradizionale (Baldini e Scaramuzzi, 1952). Inoltre, è d'obbligo puntualizzare che le mutazioni gemmarie, verificatesi nel corso dei secoli e fissate per via vegetativa, hanno contribuito ad aumentare il numero di genotipi e, quindi, di cultivar. Con la scoperta della moltiplicazione vegetativa, si può supporre che l'uomo per la prima volta si sia imbattuto in quella che per secoli sarà una delle tecniche principali adottate nel miglioramento genetico delle specie da frutto: la selezione clonale.

L'olivo, essendo stato coltivato in contesti pedoclimatici differenti, ha sviluppato un elevato polimorfismo o plasticità che, manifestandosi nella morfologia e nella fenologia della pianta ma anche nelle caratteristiche delle produzioni, contribuisce a creare accessioni o popolazioni locali eterogenee per le quali spesso risulta arduo trovare dei tratti fenotipici altamente discriminanti.

La grande variabilità pedoclimatica degli habitat e i frequenti incroci cultivar-cultivar e cultivar-oleastro hanno fatto sì che oggi lo stesso assetto varietale risulta caratterizzato assai frequentemente dalla presenza di cultivar popolazioni o popolazioni di cloni piuttosto che da vere e proprie cultivar (Bartolini et al., 1992).

Le varianti varietali, generate da incroci, o derivate da mutazioni somatiche, rappresentano una sorgente potenziale di materiale genetico, utilizzabile per trasmettere determinati caratteri di produzione, resa in olio, grandezza del frutto, resistenza o tolleranza agli stress biotici o abiotici, in nuovi genotipi prodotti dall'attività di miglioramento genetico.

L'importanza di tale materiale genetico e dell'enorme presenza di biodiversità presente in olivo porta alla necessità di catalogare, classificare ed identificare quante più varietà possibili al fine di conservare e salvaguardare tutto il patrimonio genetico esistente.

3. Recupero, conservazione e caratterizzazione del germoplasma

La perdita di biodiversità in agricoltura è un fenomeno che, oltre a interessare la scomparsa di geni che permettono alla biosfera di adattarsi alle continue mutazioni ambientali, producono una perdita di notevole importanza nella cultura del genere umano poiché, insieme alle specie e alle varietà, scompaiono paesaggi, sistemi produttivi, saperi, conoscenze e tradizioni ad esse legate (Negri e Veronesi, sito web). Conservare la biodiversità significa non solo mantenere la ricchezza di vita presente in un territorio ma anche preservare dall'estinzione patrimoni culturali unici che il progresso e la società di massa contribuiscono a distruggere con preoccupante velocità (Negri e Veronesi, sito web). Il concetto di emergenza associato all'erosione genetica si è imposto all'attenzione della comunità scientifica alla fine degli anni 70 quando iniziarono a essere sempre più sentite le esigenze dei consumatori di prodotti cosiddetti "puliti" e di rispetto verso l'ambiente.

Sia pure con una certa diffidenza, ma in modo sempre più convinto, le autorità governative e le organizzazioni internazionali, come la FAO, hanno sviluppato piani di recupero, valutazione e conservazione delle risorse genetiche vegetali, fissandone principi e azioni nella Convenzione della Diversità Biologica a Rio de Janeiro nel 1992. Nonostante la consapevolezza che recuperare la biodiversità di una specie è un lavoro lungo e complesso, che parte dalla raccolta e catalogazione delle presunte entità genetiche (accessioni) diffuse in un territorio sino ad arrivare ad una rivalutazione dei caratteri morfologici, agronomici delle qualità delle produzioni, si iniziò a incentivare l'adozione di misure volte alla conoscenza e alla conseguente conservazione e recupero dei germoplasmi.

Il patrimonio genetico può essere conservato *in situ* o *ex situ* (Ledig, 1986; Finkeldey e Gregorius, 1994).

Per conservazione *in situ* si intende la conservazione delle specie nelle aree di origine con lo scopo di proteggere le risorse biologiche sfruttando la crescita e lo sviluppo nel proprio habitat naturale. Si ha la creazione di aree protette naturali come riserve genetiche, riserve di biosfera parchi e oasi (Beghè, 2008). Gli obiettivi che si vogliono perseguire sono: la valutazione delle effettive risorse genetiche esistenti in natura per ciascuna specie o gruppi di specie, lo studio dei meccanismi (adattivi evolutivi, storici ed economici) che regolano il mantenimento delle diversità genetica e la sua fruizione diretta (consumo umano) ed indiretta (coltivazione, utilizzazione per programmi di miglioramento genetico); per fare ciò è necessario predisporre banche dati complete di

informazioni genetiche e tassonomiche (Sakai et al., 2000).

La conservazione *in situ* richiede il pieno coinvolgimento del territorio, è efficace solo quando il numero di individui collezionati è sufficientemente ampio; trova, però, una grossa limitazione nel problema della frammentazione degli habitat dovuto all'antropizzazione dei territori e nella conseguente contrazione delle popolazioni (Beghè, 2008).

La conservazione *ex situ* riguarda il mantenimento delle specie al di fuori del loro habitat naturale con lo scopo di assicurare il mantenimento della biodiversità e rendere le piante disponibili per l'uomo. L'obiettivo della conservazione *ex situ* è quella di mantenere i genotipi senza cambiamenti nella loro costituzione genica attraverso metodi che cercano di minimizzare la possibilità di mutazioni, selezione, deriva genetica e contaminazioni (Beghè, 2008). Per molte specie coltivate e i loro corrispondenti selvatici questo tipo di conservazione a lungo termine può essere realizzata conservando i semi a bassa temperatura e umidità. Le specie propagate per via vegetativa, possono essere mantenute *ex situ* in banche geniche come collezioni vive, oppure in vitro come colture tessutali o per crioconservazione (Karp et al., 1997). Purtroppo a causa della marcata interazione genotipo/ambiente si mantiene solo una parte della variabilità genetica dei taxa.

Per la gestione e l'utilizzazione di dette collezioni è però necessario caratterizzare i genotipi raccolti e verificare la rispondenza genetica del materiale di propagazione.

Negli ultimi decenni la domanda da parte dei consumatori di olio di oliva e olive da mensa è cresciuta in maniera esponenziale. Tutto ciò anche grazie agli studi effettuati sui frutti e sugli effetti benefici che hanno sul nostro organismo. Tali effetti derivano dalla presenza degli acidi grassi essenziali polinsaturi e dalle proprietà antiossidanti e antinfiammatorie dei componenti fenolici, in grado di combattere la sintesi dei radicali liberi e il conseguente invecchiamento cellulare (Owen et al., 2000a, 2000b, Visioli et al., 2004), oltre che di composti minori come per esempio la vitamina E (alfa-tocoferolo) (Ramírez-Tortosa et al., 1999; Gimeno et al., 2002).

L'azione protettiva svolta dall'olio di oliva è ormai nota su numerose patologie come per esempio quelle legate al sistema cardiovascolare (Orlandi et al., 2003), neurologico (Bisignano et al., 1999; Fitó et al., 2007), e contro alcune forme tumorali (Stoneham et al., 2000).

Le caratteristiche qualitative, nutraceutiche e salutistiche sono strettamente correlate al genotipo e all'interazione di questo con l'ambiente di coltivazione. Da ciò nasce

l'esigenza di contraddistinguere e valorizzare il prodotto in termini di qualità con i marchi di Denominazioni di Origine Protetta (DOP) e di Indicazione Geografica Protetta (IGP).

L'olivo a differenza di altre specie coltivate, ha conservato un vastissimo patrimonio genetico, rappresentato da un eccezionale numero di cultivar, oltre che da popolazioni di piante selvatiche e ecotipi. Tale germoplasma rappresenta una fonte di variabilità di fondamentale importanza per la conservazione e il miglioramento genetico della specie. Per poter utilizzare questa risorsa è necessario disporre di una serie di dati circa le relazioni genetiche che intercorrono tra le diverse cultivar e tra queste e le piante selvatiche; i meccanismi di controllo genetico dei principali caratteri da selezionare ed in particolare l'identità dei geni che controllano tali caratteri e loro espressione; la regolazione nelle diverse fasi di sviluppo della pianta e nei diversi organi. Le informazioni genetiche devono essere associate alla caratterizzazione morfologica, biometrica e fenologica.

4. Caratterizzazione morfologica

La caratterizzazione morfologica, fu il primo modello di studio atto ad identificare i caratteri idonei attraverso i quali classificare e riunire le caratteristiche delle cultivar dell'olivo e possibili cloni presenti. Già agli inizi dell'700 il Tournefort (1719) in Francia, il Tavanti (1819) in Italia e Clemente (1847) in Spagna, proponevano come base di identificazione e classificazione i caratteri botanici riferiti all'osservazione di foglie, frutti, infiorescenza ed endocarpo. I primi modelli presentati, però, non sono stati sufficienti a descrivere in maniera esaustiva e univoca le varietà. Successivamente il metodo è stato ripreso da altri Autori aggiungendo come elementi di base dello studio i caratteri morfologici del frutto e delle foglie, l'habitus vegetativo, la fenologia della riproduzione e elementi di valutazione sul comportamento agronomico (Marinucci 1932; Zito 1934; Ciferri et al., 1942; Baldini e Scaramuzzi 1952). Il modello di Ciferri del 1942, consisteva in una scheda elaiografica (Ciferri et al., 1942) che consentiva l'identificazione varietale con un grado di attendibilità soddisfacente, prevedendo rilievi accurati, in ambiente omogeneo. Più recentemente sono stati aggiunti caratteri di tipo quantitativo (biometrie del frutto, delle foglie, dei rami e delle mignole) e di tipo qualitativo, meno soggetti a variabilità (Di Prima, 1949; Baldini e Scaramuzzi, 1952; Bottari e Spina, 1952; Armellini, 1956; Ferrara et al., 1980; Barranco e Rallo,

1984).

Un altro supporto, dopo quello proposto da Ciferri et al. (1942), fu la scheda specifica presentata dall'UPOV nel 1985 (Unione Internazionale per la protezione di nuove varietà) che prendeva in considerazione i caratteri della pianta, rami fruttiferi, foglie, infiorescenze, fiori, frutti ed endocarpo, con l'obiettivo di poter uniformare la metodologia in modo tale che i rilievi e le osservazioni dei caratteri in esame fossero presi allo stesso modo da tutti i ricercatori e studiosi.

Nel 1998 si ha un'innovativa scheda presentata da Bartolini per la descrizione mondiale del germoplasma dell'olivo. In particolare, vengono ad aggiungersi: dati del passaporto, dove veniva inserito il nome più comune della cultivar o gli eventuali sinonimi, il paese d'origine, le zone predominanti di coltura, l'importanza della cultivar per i territori di riferimento e la destinazione del prodotto. I caratteri dell'albero e i caratteri agronomici quali produttività, resa in olio, tolleranze a stress biotici ed abiotici; vengono inoltre introdotte per la prima volta indicazioni importanti come la presenza di brevetti, collezioni e dati riguardanti la caratterizzazione biochimica e molecolare (Bartolini, 1998).

Nel 2000 si ha la pubblicazione del “Catalogo Mondiale delle Varietà di Olivo”, edito dal Consiglio Oleicolo Internazionale (C.O.I.) con l'obiettivo di unificare le metodologie di classificazione per l'olivo. Tali schede sono costituite da una lista di caratteri descrittivi accompagnati da una sintetica valutazione bioagronomica (Barranco et al., 2000a). Le informazioni da inserire in queste schede, dovevano riguardare i “dati del passaporto”, i “caratteri morfologici” (sia in termini qualitativi che quantitativi) e le “considerazioni agronomiche e commerciali”.

Dopo quest'ultimo tentativo da parte del C.O.I. di unificare le metodologie di classificazione dell'olivo, anche altri addetti al settore apportarono il loro contributo ma senza sostanziali modifiche (Cicoria et al., 2000; Pugliano et al., 2000; Cimato et al., 2001; Rotundo e Marone, 2002; Parlato e Pandolfi, 2003; Bassi, 2003; Caruso et al., 2007; Baldoni et al., 2011).

La scheda proposta da Bartolini, raccoglieva tutte le informazioni complete e relative ad ogni varietà nota di olivo, indipendentemente dall'importanza dei caratteri considerati (Bartolini et al., 2005), ma il tentativo di identificazione varietale risultò alquanto difficoltoso per via dello stesso assetto varietale dell'olivo assai frequentemente caratterizzato dalla presenza di cultivar-popolazioni e di cloni piuttosto che da cultivar monoclonali (Bartolini et al., 1992).

Per superare tale difficoltà, nel corso degli anni, sono stati identificati gli elementi morfologici relativi al frutto, alla pianta o alla composizione acidica dell'olio più idonei a discriminare le varietà mediante l'analisi statistica multivariata (Barone et al., 1995; Perri et al., 1995; Cantini et al., 1999; Barranco et al., 2005; Marra et al., 2013; Beghè, 2008).

Grazie all'introduzione e all'utilizzo di nuove tecnologie hanno cominciato a prendere campo nuove metodologie di indagine più precise come i marcatori molecolari e le analisi chimico-organolettiche dell'olio costituendo le basi per le più recenti schede eliografiche. Nonostante gli sforzi effettuati in passato, infatti, i marcatori morfologici da soli non costituiscono un valido elemento per poter fare chiarezza e così identificare e classificare le diverse cultivar/popolazioni e cloni di olivo, in quanto sono caratterizzati da una elevata variabilità ambientale.

Per riuscire ad identificare, classificare, catalogare e conservare l'enorme patrimonio genetico dell'olivo è necessaria l'integrazione tra i marcatori morfologici e le recenti tecniche genetico-molecolari.

5. Caratterizzazione molecolare

Nell'ultimo decennio grazie all'introduzione di nuove tecniche di biologia molecolare è stato avviato un ampio lavoro di prospezione dell'intero germoplasma olivicolo mediante l'impiego di una vasta gamma di marcatori molecolari che stanno permettendo di studiare la variabilità genetica dell'olivo (Bracci et al., 2011). I marcatori molecolari consentono di revisionare il genere *Olea* dalle diverse forme di *Olea europaea*, analizzare le relazioni che intercorrono tra le cultivar, gli olivi selvatici e l'origine dell'olivo coltivato. Inoltre, un grande interesse è rivolto circa l'identificazione di marcatori molecolari associati ai caratteri agronomici più importanti.

I marcatori molecolari rivelano siti neutrali di variazione a livello della sequenza nucleotidica del DNA. I vantaggi di tali marcatori sono numerosi. In particolare non subiscono interferenze da parte dell'ambiente e dallo sviluppo della pianta, sono abbondanti e coprono qualsiasi parte del genoma (trascritto e non), permettendo così di rilevare differenze anche tra individui geneticamente simili e fenotipicamente indistinguibili.

L'avvento dell'analisi del DNA basata sulla tecnica della PCR (Polymerase Chain Reaction), che consente di amplificare specifiche porzioni di DNA, ha condotto alla

diffusione di una varietà di marcatori molecolare tra cui:

I RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) che si basano sull'amplificazione in PCR di regioni casuali di sequenze non note di DNA, mediante primers arbitrari di dieci basi. L'applicazione dei RAPD, impiegata in molteplici ricerche offre svariati vantaggi, presentando elevato potere discriminante, velocità operativa, bassi costi e quantità di DNA necessarie per le analisi. Purtroppo, i RAPD sono marcatori dominanti e quindi non discriminano progenie gli individui eterozigoti da quelle omozigoti dominanti; inoltre, i risultati sono scarsamente riproducibili tra i diversi laboratori. Questa tecnica in passato è stata applicata con successo in molti lavori per discriminare le cultivar di olivo (Fabbri et al., 1995; Belaj et al., 2002). Un studio condotto da Perri et al. nel 1999 su 36 accessioni siciliane tramite l'utilizzo dei RAPD ha rilevato ad esempio un alto grado di poliformismo nel DNA e quindi elevata variabilità nel germoplasma olivicolo siciliano analizzato (Perri et al., 1999). Attraverso la tecnica RAPD sono state identificate da Belaj et al. (2002) 103 cultivar provenienti dalla World Germplasm Bank di Cordoba (Spagna). In tale analisi, sono stati evidenziati nel dendrogramma di similarità genetica tredici raggruppamenti principali.

Gli *AFLP* (Amplified Fragment Length Polymorphism) risultano essere più affidabili dei RAPD perché si basano sull'amplificazione dei frammenti ottenuti dalla digestione di DNA genomico con enzimi di restrizione e sulla amplificazione selettiva successiva dei frammenti recanti adattatori a sequenza nota. Questa tecnica offre tanti vantaggi. Sono marcatori sia dominanti sia codominanti tanto che sono da considerare un ottimo strumento per scopi di fingerprinting e analisi di linkage. Tra gli svantaggi si annovera la necessità di disporre di DNA in grande quantità e di qualità, privo di contaminanti, che inibiscano gli enzimi di restrizione inoltre non è altamente riproducibile. La tecnica è per di più abbastanza costosa. Gli AFLP sono stati i primi marcatori utilizzati nella comprensione delle relazioni genetiche intercorrenti tra le diverse forme di *Olea* esistenti e l'olivo coltivato (Angiolillo et al., 1998; Labombarda e Fontanazza 2002; Strikic et al., 2005). In olivo sono stati adoperati per la discriminazione varietale da molti ricercatori e hanno permesso di risolvere diversi casi di sinonimie ed omonimie come ad esempio quelli trovati in Sicilia (Angiolillo et al., 1999; Baldoni et al., 2002; Baldoni et al., 2003; Labombarda e Fontanazza 2004), in Campania (Ambrosino et al., 2004), in Puglia (Resta et al., 2002).

I microsatelliti o *SSR* (Simple Sequence Repeats) sono sequenze di 2-6 paia di basi azotate ripetute in tandem e presenti in gran numero nel genoma delle piante. La

ripetizione AT è la più frequente nelle piante mentre nei mammiferi è più frequente la ripetizione AC/TG. I microsatelliti sono abbondanti e dispersi nel genoma, presentano un livello elevato di variabilità all'interno di ciascuna specie; questa caratteristica li rende un ottimo strumento sia per la mappatura sia per il fingerprinting. I vantaggi dei microsatelliti risiedono nella loro elevata riproducibilità e nel loro elevato grado di polimorfismo dovuto all'alto tasso di mutazione delle sequenze. L'aspetto negativo di tale tecnica è rappresentato dagli alti costi iniziali di identificazione dei microsatelliti. Nonostante tutto gli SSR risultano essere marcatori molecolari molto efficaci nell'identificazione e discriminazione delle cultivar di olivo, grazie alla loro trasferibilità, alto polimorfismo e co-dominanza, come ampiamente documentato dalla letteratura scientifica (Rallo et al., 2000; Bandelj et al., 2002; Carriero et al., 2002; Belaj et al., 2003; Belaj et al., 2004; Belaj et al., 2005a; Belaj et al., 2005b; Diaz et al., 2005a; Diaz et al., 2005b; Lopes et al., 2005; Ganino et al., 2007). Aspetti morfologici, fenologici e studi molecolari tramite marcatori SSR sono stati utilizzati in Sicilia per la caratterizzazione del germoplasma esistente in questa regione (Caruso et al., 2005). L'uso combinato di RAPD e SSR ha permesso inoltre di risolvere alcuni casi di sinonimie (Barranco et al., 2000b; La Mantia et al., 2006; Ganino et al., 2007).

Attualmente gli studi di genotipizzazione prevedono l'analisi dei polimorfismi di DNA a livello del singolo nucleotide (*SNP*, Single Nucleotide Polymorphism). Le analisi misurano la loro frequenza e la loro distribuzione sul genoma. Questi marcatori molecolari di recente sviluppo si prestano bene per tale tipo di studio poiché risultano essere molto abbondanti e ad elevato potere discriminante non solo in campo animale ma anche vegetale (Rafalsky, 2002). In generale gli SNP risultano essere molto più stabili rispetto ai microsatelliti. La loro analisi è facilmente realizzabile, inoltre, su sistemi completamente automatizzati. Infatti lo studio del polimorfismo può essere eseguito su diverse piattaforme e con diverse tecnologie (Vignal et al., 2002). Un esempio riguarda l'uso dei microarray supporti per centinaia di oligonucleotidi che permettono di evidenziare contemporaneamente altrettanti SNP (Consolandi et al., 2007).

Gli SNP sono stati utilizzati per la prima volta a Cordoba per classificare cultivar di olivo ottenendo buoni risultati (Díaz e Bermúdez, 2005). Successivamente 361 accessioni della collezione mondiale di olivo sono state caratterizzate a livello di diversità e struttura genetica mediante l'analisi di SNP, SSR, DArTs (Belaj et al., 2012). Gli SNP Hanno inoltre permesso di discriminare 49 varietà di olivo selezionate per la

produzione di olio nel bacino del Mediterraneo (Consolandi, 2007). Sono stati trovati nel 2009 nove nuovi SNP in olivo a livello della sequenza di due geni, OEX (Cycloartenol synthase) e OEW (lupeol synthase), studiata su 16 cultivar tunisine, e validati attraverso la genotipizzazione di 24 cultivar. Un confronto con il potere discriminante dei marcatori SSR è stato anche effettuato. Gli autori propongono l'uso combinato dei marcatori SNP e SSR come ottimo strumento per l'identificazione varietale e rintracciabilità dell'olio d'oliva (Hakim et al., 2009).

Attualmente sta prendendo campo la genotipizzazione attraverso tecniche di sequenziamento di ultima generazione che in futuro consentiranno la selezione genomica degli individui. Nel dicembre del 2010 è stato avviato, con un finanziamento del MiPAAF, il progetto di ricerca "OLEA" sulla "Genomica e Miglioramento Genetico dell'Olivo", finalizzato all'applicazione di approcci di analisi di genomica avanzata all'olivo. Il Progetto "OLEA" propone di attuare ricerche finalizzate all'acquisizione di conoscenze per preservare e valorizzare le risorse genetiche disponibili, aumentare la produttività e precocità di entrata in fruttificazione delle piante, aumentare la resistenza ai principali patogeni e parassiti e agli stress abiotici, favorire l'adattamento dell'albero ai diversi sistemi agronomici sostenibili per le diverse olivicolture, e il miglioramento della qualità commerciale, nutrizionale e organolettica e del valore salutistico dell'olio e delle olive.

6. Panorama varietale dell'olivo nel bacino del Mediterraneo

Il principale paese produttore di olio e olive da mensa nel bacino del Mediterraneo è la Spagna. Il pool genetico di olivo spagnolo è caratterizzato da una grande abbondanza di vecchie cultivar coltivate in ristrette aree d'origine –272 cultivar con 501 denominazioni varietali (Barraco et al., 2005). In questo enorme pool genetico si distinguono 24 varietà principali. Tra le cultivar da olio, la varietà più diffusa è la Picual. Negli ultimi anni si è riscontrata una crescita costante di nuovi impianti di Arbequina e Arbosana, cultivar che si adattano perfettamente ai nuovi sistemi di tipo superintensivo (1.500 piante/ha) che, stanno iniziando a riscuotere un certo successo anche al di fuori dei confini iberici (Rallo, 2006). Le principali olive da tavola coltivate sono: la Gordal Sevillana, la Morona, la Manzanilla de Sevilla, la Alogaña, la Hojiblanca e la Manzanilla Cacereña, queste ultime due cultivar a duplice attitudine.

La Grecia è il probabile centro di prima diffusione dell'olivo verso l'Italia Meridionale.

La cultivar da olio più diffusa è la Koroneiki, che si adatta ai nuovi sistemi di impianto intensivi semi-meccanizzati. Tra le cultivar da mensa, famose in tutto il mondo per la loro dolcezza, ricordiamo la Amphis, la Kalamon, la Chalkidikis e la Throubolia il cui frutto maturo è edule senza che sia sottoposto a processi di deamarizzazione (Metzidakis et al., 2006).

In Portogallo, l'olivicoltura è sviluppata in sette regioni grazie alla sua grande capacità di adattarsi alle diverse condizioni ambientali sia in termini di suolo che di clima. Quasi l'80% degli alberi di olivo appartengono alla cultivar da olio Galega (Pinheiro, 2006). In Francia, la coltivazione dell'olivo è presente solamente nelle regioni Meridionali (Roussos et al., 2006). L'attuale germoplasma autoctono, che annovera 123 accessioni in collezione presso il "*Conservatoire Botanique National Méditerranéen de Porquerolles* (CBNMP)", è il risultato di pressioni selettive centenarie (Khadari et al., 2002). Le principali varietà coltivate sono la Picholine, la Saloneche, la Berruguette e la Tanche (Shall, 2006; Roussos et al., 2006).

In Turchia la coltivazione dell'olivo si sviluppa soprattutto nelle zone costiere bagnate dal mar Egeo e dal Mediterraneo. Il grosso della produzione nazionale si ha nella regione Egea dove le maggiori cultivar sono Ayvalik Yaglik, Domat, Enkerce e Memecik (Zafer Can et al., 2006).

L'olivicoltura in Iran è antica tanto che si sono affermate diverse varietà di olivo autoctone, rappresentate principalmente da due popolazioni policlonali, comunemente note come Zard e Roghani (Zeinanloo 2006).

La coltura dell'olivo in Libano è conosciuta da diversi millenni. Tra le numerose varietà coltivate in Libano distinguiamo: Sourì o grande Sourì, Beladi, Ayrouni, Chami, Smoukmouki. Altre varietà straniere sono state introdotte dall'Istituto di Ricerca dell'Agricoltura che ha provveduto a piantare fin dal 1965 una raccolta di olivi italiani, francesi e varietà greche (Bassal, 2006).

Il territorio di Israele sta puntando sempre più sull'olivicoltura tanto che in pochi anni la superficie investita a oliveto è cresciuta, quasi triplicata. Sono coltivate: Leccino, Coratina, Koroneiki, Sourì.

L'olivicoltura in Tunisia è caratterizzata da un'ampia distribuzione in tutto il paese che si estende da nord a sud, ma la zona di maggiore densità di coltivazione è il centro (Jardak, 2006). Le risorse genetiche tunisine sono molto ricche, si contano più di 50 varietà ed ecotipi distribuiti in tutto il Paese. Tra loro, le due varietà principali sono il Chetoui nel Nord e Chemlali nel Centro e nel Sud (Jardak, 2006).

In Marocco le cultivar di maggiore spicco e maggiore diffusione sono la Moroccan Picholine, utilizzata sia per l'olio che per la tavola. Sebbene l'albero si sia ben adattato alle condizioni climatiche locali, in questi ultimi anni, altre varietà sono state introdotte da altri Paesi o selezionate dalla stessa varietà Picholine (Ismaili Alaoui, 2006).

Tra i paesi del Medio Oriente, merita anche di essere citata la Siria, quarto paese produttore di olive nel Bacino del Mediterraneo (dati C.O.I.) che, insieme all'Iran, è considerata da molti autori l'areale di origine della specie. Nonostante siano state identificate 75 cultivar nel territorio, sei varietà costituiscono quasi il 92% degli oliveti: (Al Hibrahem, 2006).

La Giordania rappresenta uno degli habitat naturali dell'olivo, dove peraltro è molto facile riscontrare forme selvatiche. Queste sono di antica origine genetica sviluppata in particolare da piante che presentano una base genetica stabile, che risulta essere di fondamentale importanza per i programmi di miglioramento genetico delle piante (Ayoub, 2006). Nabali rappresenta oltre il 70 % delle cultivar coltivate in Giordania (Ayoub, 2006).

Anche l'Egitto, rappresenta un Paese importante per l'olivicoltura del bacino del Mediterraneo. Il panorama varietale autoctono in Egitto è molto vasto, essendo rappresentato da quasi 50 varietà ed alcune di loro sono di grande interesse (Al Ibrahim, 2006).

Nei Paesi al di fuori del bacino del Mediterraneo, l'olivicoltura si è sviluppata solo di recente attraverso l'introduzione di varietà provenienti da altri Paesi, quindi su una base genetica non propria (Sebastiani et al., 2006).

L'Australia sta investendo sempre più sull'olivicoltura. Il panorama varietale australiano è caratterizzato da cultivar che hanno avuto origine nel bacino del Mediterraneo, soprattutto cultivar italiane, spagnole e greche, tra le quali Frantoio, Leccino, Coratina (Italia), Arbequina, Picual, Manzanillo (Spagna), Koreneiki e Kalamata (Grecia), che da sole producono quasi il 90% dell'olio australiano.

Negli Stati Uniti, invece le olive vengono coltivate in California, e in misura minore, in New Mexico, Arizona e Texas. In California si concentra il 99% della produzione di tutte le olive americane (Ferguson, 2006). Questo costituisce però solo 0,5-1 % di olive coltivate in tutto il mondo. Le cultivar principalmente coltivate sono Manzanillo ed Ascolano, Barouni, Sevillano e Mission.

In Messico circa il 95 % delle olive appartengono alla varietà Manzanilla.

In Argentina la maggior parte dell'olivicoltura è concentrata nelle province di San Juan,

San Luis, Mendoza e Còrdoba dove viene prevalentemente coltivata la varietà Arauco, caratterizzata per le grandi dimensioni e la carnosità della polpa. (Ayerza et. al., 2001).

7. L'olivo in Italia

L'Italia, secondo Paese produttore mondiale di olio, vanta di un patrimonio genetico straordinario, con una distribuzione geografica abbastanza localizzata ed in alcuni casi addirittura puntiforme caratterizzato da una grandissima variabilità genetica (Bartolini et al., 1994). In Italia sono presenti più di 500 cultivar che coprono il 58% della superficie investita in olivo

Per quanto riguarda la produzione di oli, la Puglia è la principale regione con il 37,59% di produzione di olio del totale nazionale, segue la Calabria con il 28,13% e la Sicilia con il 9,66% (fonte dati ISTAT 2012).

Il settore olivicolo italiano, sta attraversando una fase di crisi strutturale riconducibile, soprattutto, alle difficoltà che incontra nell'adattarsi ai profondi cambiamenti in atto nel contesto economico e istituzionale. Alla crisi economico-finanziaria globale degli ultimi anni, si sono sommati gli effetti di un'olivicultura obsoleta costituita in prevalenza da impianti tradizionali a bassa densità (con meno di 200 piante per ettaro) che ne limitano sia la meccanizzazione che le rese produttive da una forte polverizzazione aziendale. Per superare questa posizione di stallo diversi autori, hanno raccomandato l'adozione di oliveti a più alta densità d'impianto, progettati per la raccolta meccanica e capaci di garantire rese più elevate e costi di produzione più bassi (Fontanazza 2000; Tombesi et al., 2008). Però allo stato attuale le sole varietà che si prestano bene all'impiego in olivicultura superintensiva sono: le spagnole Arbequina e Arbosana e, la greca Koroneiki. Certamente l'utilizzo di cultivar estere escluderebbe l'olivicultura italiana dalla possibilità di ottenere qualsiasi denominazione d'origine per il suo prodotto, e abbandonerebbe quello che rappresenta per l'Italia il prodotto di élite, caratterizzato nel possedere un'elevata qualità. A tal proposito, sono in corso ricerche e studi sul nostro germoplasma autoctono, in cui i primi dati sulle varietà italiane indicano una scarsa adattabilità di alcune di queste (come la Frantoio e la Biancolilla, probabilmente anche la Coratina) al suddetto modello colturale.

La selezione di portainnesti nanizzanti potrebbe avere un forte impulso per l'adozione di modelli d'impianto intensivi e superintensivi, che però, richiedono ancora molti studi e ricerche nel settore olivicolo.

8. La banca mondiale del germoplasma dell'olivo

Vista l'enorme variabilità genetica presente nell'olivo ed all'importanza che essa ha in ambito economico, culturale, paesaggistico e salutistico, la ricerca ha riposto grande attenzione sulla individuazione e caratterizzazione delle varietà olivicole. Purtroppo il pool varietale è solo in parte conosciuto, conservato e caratterizzato in maniera esaustiva.

Diversamente da quello che succede in altre specie arboree, l'olivo, specie altamente longeva, capace di autorigenerarsi, ha tramandato sino ai nostri giorni una consistente quota della diversità genetica della specie, essendo stati assai limitati i fenomeni di erosione genetica al suo interno (Fiorino e Lombardo, 2002). Non si può escludere l'ipotesi che, ancora oggi vengano coltivate nei diversi paesi olivicoli, cultivar che erano state apprezzate e coltivate in epoca remota, ma che l'usuale comportamento degli agricoltori a non utilizzare denominazioni univoche per le varietà, ha portato ad una confusione varietale tale da non riuscire ad identificare il panorama varietale odierno con quello remoto.

Sicuramente man mano che i sistemi di coltivazione sono mutati, alcune varietà sono andate perdute a vantaggio di altre entità genetiche selezionate per produttività, dimensioni del frutto, rese in olio, resistenza agli stress biotici e abiotici, o di nuove varietà originatesi spontaneamente per disseminazione naturale. La mancanza di uno standard varietale, ha portato numerosi casi di omonimie e sinonimie che rende più difficile l'identificazione, tanto che tuttora ve ne sono molte non classificate ed altre ancora sconosciute (Ganino et al., 2006). Facilmente riscontrabili nei distretti olivicoli di vecchio insediamento e dove non si è avuto ammodernamento nei criteri di gestione culturale, è facile trovare genotipi non identificati o noti soltanto a livello locale.

Tuttavia, negli ultimi decenni, la costituzione di campi di collezione varietale e la scoperta di tecniche di biologia molecolare stanno sicuramente dando un contributo essenziale per la conoscenza della variabilità genetica complessiva della specie *Olea europaea* L.

A tale scopo, anche per l'olivo, si sono iniziate a costituire le banche di germoplasma che sono gli strumenti di base per la selezione e il miglioramento genetico in quanto consentono la salvaguardia e la caratterizzazione delle importanti risorse genetiche.

Vista l'importanza di tale materiale vegetale sono stati avviati programmi atti alla conservazione della diversità genetica con la costituzione di numerose collezioni nei principali paesi olivicoli (www.oleodb.eu).

La costituzione di un campo di collezione che contenga tutto il patrimonio olivicolo internazionale è stato già avviato nel 1970 grazie a un progetto di ricerca chiamato RESGEN, a cui hanno collaborato la Food and Agriculture Organization (FAO) e il Comitato Olivicolo Internazionale (COI), che ha portato alla formazione della Banca Mondiale del Germoplasma di Olivo sita presso campi del CIFA “Alamena de Obispo” a Cordoba, in Spagna, che rappresenta una delle più importanti banche del germoplasma olivicolo, nella collezione di Cordoba sono presenti 406 accessioni provenienti da tutti i paesi olivicoli di cui soltanto 224 sono state autenticate (Caballero et al., 2006).

Altre importanti banche sono quella di Rende (CS) in Italia e quella di Marrakech presso Tassaout in Marocco.

Studi realizzati sulle varietà coltivate in Spagna, Italia, Grecia, Tunisia, Turchia, Portogallo e Francia, hanno evidenziato un complesso pool varietale della specie, superiore al migliaio di cultivar, la cui antichità è testimoniata dalla presenza di piante secolari spesso localizzate nelle vicinanze degli antichi centri “urbani”.

Il rinnovato interesse da parte dei consumatori verso la qualità delle produzioni tipiche oggi associate all'origine ed alla tipicità dell'olio di oliva e delle olive da tavola, garanzia di sicurezza e salubrità ha indotto le comunità scientifiche ad attivarsi affinché si eviti il più possibile la perdita della specificità varietale e la scomparsa di genotipi potenzialmente interessanti.

L'identificazione e la classificazione del germoplasma olivicolo autoctono, il suo recupero e la sua conservazione, ma anche la ricerca di caratteri importanti dal punto di vista agronomici nel nostro germoplasma si rendono oggi più che mai necessari per la produzione del germoplasma del domani. Tutto ciò implica la necessità di individuare ed applicare precisi metodi di discriminazione per la salvaguardia delle cultivar e dei numerosi cloni di olivo che nel corso dei millenni di coltivazione si possono essere differenziati negli areali principali di diffusione e negli areali secondari di differenziazione (Besnard et al., 2001).

Un esteso e approfondito lavoro di revisione di Caballero e Del Rio (1999) ha contato 1304 cultivar censite in 10 Paesi del Bacino del Mediterraneo. Nonostante la mancanza di censimenti varietali in alcuni distretti olivicoli, sulla base di indagini su soltanto alcuni territori (Spagna, Italia) si è potuto stimare che almeno 1500 cultivar possano costituire la piattaforma genetica dell'olivo nel Mediterraneo (Barranco e Rallo, 1984; Tous e Romero, 1993). Ulteriori studi, basati su revisioni bibliografiche delle produzioni scientifiche in materia negli ultimi 50 anni, hanno elencato 3276 nomi e

circa 1200 cultivar in 79 collezioni di 34 Paesi (Bartolini et al., 1999). Nonostante la complessità del lavoro, l'attività di caratterizzazione varietale di olivo ha prodotto dei risultati importanti che possono essere riassunti come segue: un totale di 1441 accessioni sono tenute in collezione in 15 Paesi di cui 851 in Portogallo, Spagna, Italia, Francia e Grecia, 484 in Marocco, Algeria, Tunisia, Egitto e Siria e 106 in Slovenia, Croazia, Jugoslavia, Cipro e Israele (Caballero et al., 2006).

Tra queste accessioni, i programmi di validazione su base morfologica hanno potuto individuare 523 cultivar distribuite nei paesi suddetti e le informazioni sulle caratteristiche elaiografiche sono attualmente raccolte e disponibili agli utenti sul sito del COI (www.internationaloliveoil.org/resgen/index.html).

Grazie al lavoro svolto da vari istituti di ricerca e dalle università nei vari areali olivicoli sulla diversità genetica e sull'individuazione delle cultivar autoctone, la Banca Mondiale del Germoplasma è ancora un cantiere aperto che annualmente si arricchisce di nuove cultivar. Ultimamente è stato inoltre creato un campo "replica" in Marocco presso Tassaout, Marrakech con le varietà che hanno subito un processo di certificazione genetica e sanitaria nei loro paesi di provenienza.

9. Il germoplasma dell'olivo in Sicilia

La Sicilia, posta al centro del bacino del Mediterraneo, ha rappresentato per secoli un punto di incontro fra civiltà diverse le quali hanno contribuito a creare un'ampia diversificazione genetica del patrimonio vegetale dell'Isola.

L'olivo con tutta probabilità è stato introdotto dai Fenici, i quali nella loro migrazione iniziata nel XVI sec. a.C., ne diffusero la coltivazione nell'Asia Minore, in Egitto, in Libia, in Grecia e nelle isole dell'Egeo e da qui sicuramente in Sicilia, tra il IV e l'VIII sec. a.C., come dimostrano le testimonianze di Diodoro Siculo sugli insediamenti fenicio-cartaginesi di Akragas.

Successivamente, in età Imperiale, l'olivo raggiunse il massimo grado di diffusione sia in Sicilia sia in tutte le terre del Mediterraneo colonizzate dai Romani (Plinio il Vecchio).

L'ampio utilizzo quotidiano dei suoi prodotti nella società Romana (unguenti, legna da ardere, olio per combustione) fece dell'olivo la "*prima omnium arborum*" (Columella in De Rustica V, 8,1).

I romani introdussero alcuni importanti perfezionamenti nella tecnologia olearia.

Con la caduta dell'Impero Romano e la dominazione arabe in Sicilia, la coltura dell'olivo subì un declino a favore di altre specie, quali gli agrumi.

Dopo l'anno Mille, durante il Medioevo, si ebbe un graduale ripopolamento delle zone olivetate e un rilancio del commercio dell'olio.

Ma è solo a partire dalla prima metà del Cinquecento che l'olivo iniziò ad imporsi come coltura principe dell'agricoltura siciliana.

Il fenomeno era particolarmente presente nel Valdemone, nel palermitano e cominciava a estendersi anche nella zona sud-orientale dell'isola, cosicché l'unico territorio in cui l'olivicoltura era ancora quasi assente era l'area corrispondente all'attuale provincia di Trapani, che, eccezion fatta per la Valle del Belice, continuava a importare olio dalla Sicilia Orientale. Notizie storiche riportano che nel 1700 nella Valle del Belice si praticava la coltura intensiva dell'olivo probabilmente basata sulla cultivar Nocellara del Belice.

Alla fine del XIX secolo si stimavano in Sicilia circa 17 milioni di piante coltivate su 200.000 ha in coltura promiscua e 70.000 in coltura specializzata.

In Sicilia allo stato attuale si stima che la coltura dell'olivo incida su una superficie 159.402 ettari e interessi 140.164 aziende (fonte ISTAT 6 Censimento in Agricoltura). L'olivicoltura in Sicilia riveste il 2,98% della S.A.U. e l'11,3% della superficie investita a colture arboree (fonte ISTAT 2012). La maggior parte degli oliveti sono volti alla produzione di olio tanto che gli impianti specializzati per la produzione di olive da consumo diretto inciderebbero solamente su una superficie di circa 3830 ettari (Fonte ISTAT maggio 2012).

La grande variabilità di ambienti pedo-climatici presenti in Sicilia ha fatto sì che i genotipi selezionati dagli antichi agricoltori e quelli provenienti da altri Paesi del Mediterraneo abbiano trovato le condizioni adeguate per prosperare pertanto, ancora oggi, il panorama varietale autoctono dell'olivo in Sicilia è caratterizzato da una notevole complessità e ricchezza.

Le indagini storiche condotte sul patrimonio autoctono della Sicilia consentono di avere notizie certe a partire dalla seconda metà dell'800 (Caruso, 1882), un periodo troppo recente per poter escludere che molte delle varietà che si sono differenziate nell'Isola siano andate irrimediabilmente perdute. La prima indagine sulla piattaforma varietale del germoplasma autoctono della Sicilia, condotta a metà del secolo scorso (Bottari e Spina, 1952), aveva consentito di descrivere 31 cultivar. Di tutte le accessioni segnalate soltanto un ristretto numero costituiva la base varietale su cui si fondavano le

produzioni olearie, mentre la gran parte, per la limitata diffusione, a volte riconducibile a pochissimi esemplari, costituiva un patrimonio genetico poco conosciuto e in alcuni casi a forte rischio di estinzione.

A partire dagli anni '80, il Dipartimento di Colture Arboree dell'Università di Palermo (ex Istituto di Coltivazioni Arboree), con l'intento di valutare comparativamente le cultivar del germoplasma siciliano di olivo, preservandolo al tempo stesso da probabili rischi di erosione genetica, ha iniziato quindi un'intensa attività di indagine per rintracciare tutte le cultivar riportate nello studio di Bottari e Spina; nel corso di tale attività furono altresì rinvenute altre accessioni non descritte in letteratura. A metà degli anni '80, terminata la fase di indagine territoriale, le accessioni individuate furono reinnestate su piante adulte presenti presso l'azienda 'Campo Carboj' dell'Ente di Sviluppo Agricolo della Regione Sicilia, ubicata in agro di Castelvetro (TP). La scelta di porre le piante in un unico sito derivava dall'esigenza di svincolare la variabilità dell'espressione fenotipica da fattori legati all'ambiente. Negli anni successivi, dopo che le piante iniziarono a fruttificare, si procedette alla verifica *true to type* delle accessioni reinnestate, accertando la rispondenza dei genotipi raccolti alle cultivar descritte da Bottari e Spina (1952) mediante osservazioni dei tratti morfologici dei frutti, foglie e noccioli. In questo lavoro furono coinvolti ricercatori, vivaisti, innestatori, titolari di frantoi, commercianti di olio ed esperti olivicoltori delle varie aree di provenienza delle cultivar di olivo. Una volta validate le accessioni raccolte nell'isola, e dopo aver eliminato tutti i casi evidenti di omonimia e sinonimia e tutte quelle accessioni di origine alloctona, fu costituita, sempre all'interno dell'Azienda Campo Carboj, la prima collezione *ex situ* del germoplasma di olivo autoctono siciliano, caratterizzata a livello bio-metrico e molecolare (Barone et al., 1994; Caruso et al., 2005; La Mantia et al., 2005; Caruso et al., 2007).

Ad oggi, si può affermare che la piattaforma varietale di olivo in Sicilia consta di 25 cultivar di comprovata origine autoctona. Tutte le cultivar sono presenti in un territorio delimitato tanto che nessuna di esse è coltivata in tutta l'Isola. Tra queste, otto cultivar "principali" sono ampiamente diffuse nei loro areali di coltivazione e rappresentano la base genetica delle produzioni olearie siciliane (Fig. 1). Otto cultivar "minori" sono presenti solo in ristrette aree olivicole (Fig. 2). Sono presenti inoltre sul territorio esemplari centenari di piante di cultivar "neglette" a forte rischio di estinzione.

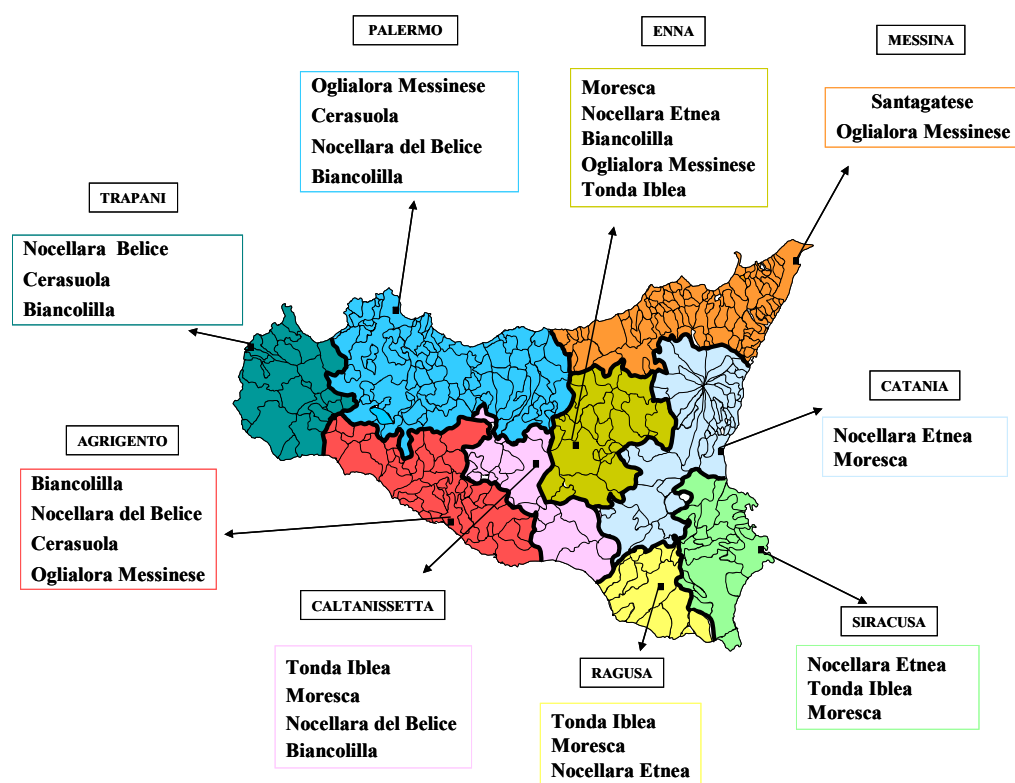


Figura 1. Diffusione delle *principali* cultivar di olivo in Sicilia

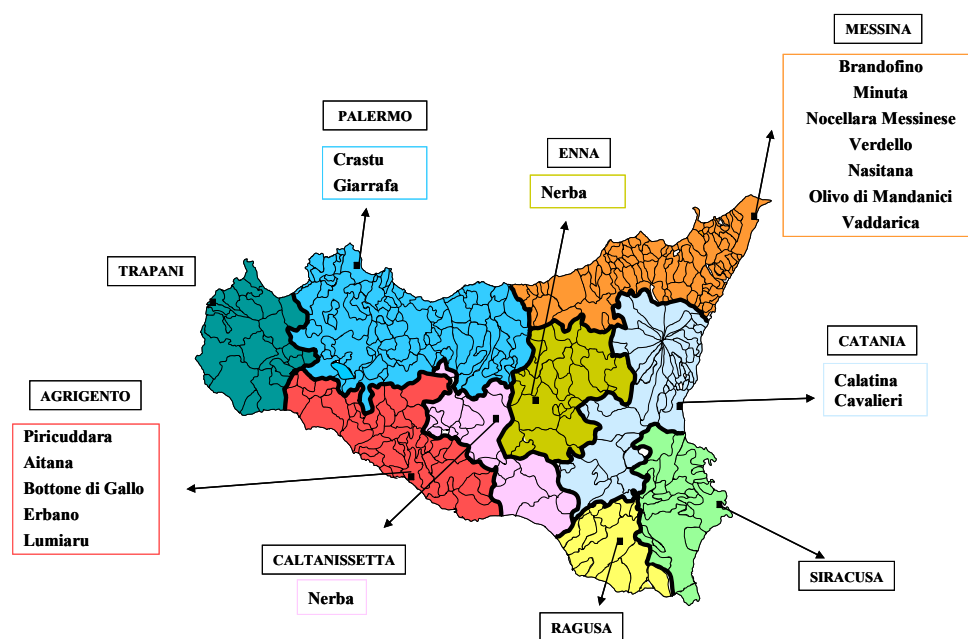


Figura 2. Diffusione delle cultivar *minori* e *neglette* nel territorio siciliano

10. Importanza della certificazione del materiale vivaistico: aspetti tecnici

Quanto finora discusso sull'esigenza dell'uniformità genetica delle piante in coltura, in ottica di un'agricoltura di precisione, rende evidente che non si possa prescindere da un sistema di certificazione per la produzione vivaistica.

La certificazione vivaistica è un processo che garantisce la produzione di materiale controllato da un punto di vista genetico e sanitario; in grado di migliorare la qualità delle produzioni frutticole, prevenire la diffusione di malattie e contribuire alla tracciabilità delle produzioni nella filiera produttiva.

I decreti ministeriali del 24 luglio 2003 e 4 maggio 2006 regolano a livello nazionale la certificazione *volontaria* del materiale di propagazione vegetale delle piante da frutto. In particolare, è attivo su tutto il territorio nazionale il servizio di certificazione di prunoidee, pomoidee, olivo, agrumi e fragola. Per l'olivo vi è un disciplinare tecnico, Decreto ministeriale del 16 giugno 1993, "Norme tecniche per la produzione di materiale di propagazione vegetale certificato di olivo". A tale certificazione nazionale per l'olivo ha aderito anche la Sicilia.

Il processo di certificazione è un sistema di controllo e produzione delle piante di olivo estremamente rigoroso e laborioso anche dopo la fase di individuazione delle fonti durante la moltiplicazione dei materiali di propagazione.

Il Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, che rappresenta l'organismo responsabile per la qualità del materiale di propagazione vegetale ottenuto attraverso il programma di certificazione nazionale, coordina e gestisce l'intero processo attraverso l'operato del Comitato nazionale per la certificazione (CNC) e dei Servizi Fitosanitari Regionali (SFR).

Il materiale certificato (portinnesti, innesti, astoni e semi), prodotto attraverso il sistema di certificazione, deriva da piante capostipiti (cultivar o portinnesti), denominate *fonti primarie*, selezionate per i caratteri pomologici, nonché saggiate e trovate esenti da specifici patogeni riportati sui protocolli che regolano la normativa.

Il processo di certificazione è articolato in quattro differenti fasi: *conservazione – pre-base; pre-moltiplicazione – base; moltiplicazione – certificato; vendita – vivaio – certificato* (Savino, 2007).

Inizialmente, una o più piante con i tipici caratteri pomologici della varietà che si vuole introdurre nel sistema di certificazione, vengono selezionate. Tale materiale sarà

innestato su portinnesti virus-esenti e saggiato per virus, viroidi, fitoplasmi e organismi virus-simili specificati sui protocolli di ciascuna specie. In caso di esito negativo di presenza di patogeni, la pianta candidata potrà essere introdotta nella fase di conservazione, il cui scopo è il mantenimento e la collezione delle diverse cultivar e portinnesti, nonché la produzione di materiale di propagazione di categoria “pre-base”. Se riscontrata invece la presenza anche di un solo patogeno, la pianta candidata verrebbe sottoposta a risanamento mediante termoterapia e propagazione in vitro. Al momento dell’introduzione di una determinata varietà nel sistema di certificazione, viene consegnata al MiPAF una scheda pomologica riportante i caratteri descrittivi della varietà ed una scheda fitosanitaria riportante le analisi effettuate e gli esiti ottenuti. In questo modo si ottiene l’iscrizione al Registro nazionale delle accessioni di cultivar, dei cloni e delle selezioni certificabili.

I controlli sanitari e genetici sul materiale di categoria “pre-base”, previsti dai disciplinari delle singole specie, sono effettuati sotto la supervisione del SFR e la responsabilità del Centro di Conservazione. I controlli pomologici vengono effettuati su piante ottenute dalla fonte primaria e messe a dimora in appositi ‘campi catalogo’ nei quali deve essere osservato almeno un ciclo di fruttificazione, sufficiente a permettere la piena corrispondenza del materiale in osservazione con il fenotipo. Nel caso di cultivar derivanti da mutazioni, questi controlli vengono effettuati tutti gli anni, onde poter accertare eventuali fenomeni di regressione.

La *conservazione* del materiale riconosciuto idoneo si attua presso Centri di conservazione per la premoltiplicazione di organismi pubblici o presso enti privati riconosciuti per l’alta professionalità. Sia gli enti pubblici che quelli privati devono essere riconosciuti idonei dal MiPAF, su proposta del Comitato Nazionale per la Certificazione.

La seconda fase del processo è la *premoltiplicazione*, che è costituita con materiale di pre-base innestato su portinnesti della stessa categoria. Le piante sono mantenute nelle identiche condizioni descritte nella fase di Conservazione, anche se lo scopo non è più il mantenimento ma la propagazione del materiale definito di categoria “base”.

La *moltiplicazione* è la terza fase del processo e si ottiene innestando materiale di base su portinnesti di pari categoria. Questa fase viene direttamente gestita da associazioni vivaistiche o da singoli vivaisti e si attua in campi di piante madri in piena aria, riconosciuti idonei dai SFR in base ai requisiti previsti dai disciplinari di produzione delle singole specie. Scopo di questa fase è la produzione di materiale di categoria

“certificato” da utilizzare in vivaio (astoni, semi, portinnesti, marze e talee). Al fine di evitare possibili infezioni, i campi di piante madri devono essere ubicati in zone preferibilmente isolate e comunque distanti da frutteti della stessa specie; il terreno deve essere sottoposto ad analisi fitopatologiche e successivamente sterilizzato. I controlli sanitari e genetici sul materiale di categoria “certificato”, previsti dai disciplinari delle singole specie, sono effettuati sotto la supervisione del SFR e la responsabilità del Centro di Moltiplicazione. Il materiale ottenuto attraverso la fase di moltiplicazione sarà di categoria certificato, virus esente o virus controllato.

L’ultima fase del sistema di certificazione è il *vivaio certificato*, dove gli astoni sono costituiti con portinnesti e marze di categoria certificata. I vivai saranno dichiarati idonei alla produzione di materiale certificato dai SFR che verificano il rispetto dei requisiti previsti dai disciplinari di produzione, quali, ad esempio, l’impianto su terreni che non abbiano ospitato specie arboree da frutto per almeno due anni e che siano separati da vivai ottenuti con materiale di propagazione non certificato (CAC).

La responsabilità nelle prime due fasi è pubblica, nelle successive è privata.

Prediligere produzioni vivaistiche certificate per la costituzione di nuovi oliveti significa assicurare le migliori condizioni di partenza dell’impianto, considerando che la maggior parte dei virus si trasmette per innesto e quindi la moltiplicazione di materiale vivaistico infetto rappresenta la loro preferenziale via di diffusione.

Al fine di rispondere al meglio alle esigenze di competitività delle aziende vivaistiche e di qualità del prodotto vivaistico e di applicare i decreti 2003-2006, è stata intrapresa un’iniziativa interregionale nel triennio 2006-2009, Progetto OLVIVA, cui hanno fatto parte 25 Istituzioni scientifiche, in dodici regioni italiane.

Quattro linee di intervento sono state intraprese:

- 1) genotipizzazione di 200 cultivar tradizionali italiane mediante un set di marcatori molecolari e descrittori morfologici comuni;
- 2) verifica dello stato sanitario del materiale di propagazione attraverso l’applicazione di tecniche innovative e standardizzate di diagnosi fitopatologica;
- 3) la costituzione di 70 fonti primarie da immettere nel sistema di certificazione;
- 4) il miglioramento degli schemi di produzione e di difesa fitosanitaria in vivaio mediante la sperimentazione e validazione di sistemi innovativi di propagazione e gestione eco-compatibile delle produzioni vivaistiche.

Il progetto ha inventariato le risorse genetiche locali, recuperando antiche varietà di olivo, che costituiscono la biodiversità del territorio italiano e definito metodologie

innovative, univoche e comuni impiegate in tutta la filiera di certificazione nazionale, assicurando standard qualitativi e garanzie fitosanitarie uniformi. Fonti Primarie sono state costituite sotto un unico marchio OLIVIVA (Baldoni et al., 2011).

II. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Uno dei principali limiti per l'avvio in olivicoltura di un'agricoltura altamente tecnologica è rappresentato dalle limitate conoscenze sulla variabilità genetica intra-cultivar e dalla necessità di definire gli standard di riferimento. Spesso la base genetica di una cultivar di olivo può essere infatti ampia, data la presenza di varianti clonali (cultivar policlonali) e siblings (cultivar-popolazione). Le performance di un sibling possono essere completamente diverse rispetto allo standard, sia per quanto riguarda la produzione di olio, la pezzatura dei frutti (nel caso di olivo da mensa), sia per quanto riguarda l'habitus vegetativo. Ciò può avere profonde ripercussioni sulla gestione d'impianto e aziendale. Sottovalutare la diversità del vigore e del portamento può avere risultati disastrosi se per esempio si è scelto di impostare l'impianto con un sistema intensivo o addirittura super-intensivo.

Inoltre, la globalizzazione del mercato dei prodotti agro-alimentari e la distribuzione degli stessi attraverso imprese commerciali con diverso tipo di organizzazione (supermercati, enoteche, botteghe alimentari) pone sempre più il problema di differenziare lo standard qualitativo del prodotto. La produzione italiana di olio extravergine di oliva, mediamente contraddistinta da elevato standard qualitativo, per poter fare fronte agli alti costi di produzione, dovrà sempre più essere indirizzata verso mercati remunerativi, disposti a pagare l'alta qualità. La possibilità di entrare e, soprattutto, di permanere nel mercato dell'eccellenza è però legata al mantenimento nel tempo delle caratteristiche qualitative che hanno determinato l'apprezzamento del prodotto stesso. Uno dei problemi che sempre più spesso viene lamentato per gli oli extravergini di alta qualità dagli utilizzatori (rivenditori, ristoratori, consumatori) è la variazione delle caratteristiche organolettiche, che oli extravergini, di origine monovarietale, commercializzati con una medesima etichetta, presentano spesso nel tempo (annata) e nello spazio (area di produzione). Malgrado su tali variazioni entrino in gioco diversi fattori agronomici e la tecnica di estrazione, scarsa attenzione è stata riservata agli aspetti genetici, ovvero alla possibilità che gli oli monovarietali, pur derivati da una medesima cultivar, in effetti abbiano origine da più genotipi, con origine comune (semenzali di medesime progenie) o che si sono differenziati nei secoli, come risposta alle variazioni ambientali o alle tecniche colturali.

Scopo del progetto di ricerca è stato verificare la diversità genetica intra-varietale delle

principali cultivar di olivo presenti nel territorio siciliano, al fine di verificare l'esistenza del grado di stabilità/variabilità di ciascuna cultivar per poi procedere alla selezione dei migliori genotipi (cloni, sibling). Nel contesto dell'affermazione e della diffusione delle tecniche proprie dell'agricoltura di precisione, si è infatti ravvisata l'esigenza di approfondire lo studio della biodiversità del patrimonio olivicolo siciliano, date le differenze nelle caratteristiche pedoclimatiche del territorio isolano, che favorisce la differenziazione e l'espressione della base genetica dei vari genotipi (cultivar, cloni, sibling). In dettaglio, nel corso dei tre anni di ricerche obiettivo principale è stato studiare la diversità morfologica e molecolare intra-varietale nell'ambito delle cultivar più diffuse in Sicilia, al fine di caratterizzare i genotipi presenti nei diversi areali, selezionando quelli che dal punto di vista agronomico soddisfano le esigenze dei vari contesti olivicoli. Per tale finalità si è agito effettuando l'analisi biometrica dei frutti, foglie e noccioli e l'utilizzo dei marcatori molecolari microsatelliti. Per quanto riguarda la scelta dei marcatori microsatelliti, si è preferito utilizzare un set di SSR ormai ampiamente utilizzato dalla comunità scientifica internazionale (Baldoni et al., 2009). Emerge inoltre l'importanza dello studio ai fini dell'identificazione e selezione di nuovi genotipi che soddisfino i requisiti per la certificazione vivaistica delle piante (D.M. Del 14/04/1997), per la tracciabilità degli oli e per la necessità di preservare i genotipi da probabili rischi di estinzione.

III. MATERIALI E METODI

1. Materiale vegetale

Il materiale vegetale necessario per la caratterizzazione molecolare e morfologica è stato prelevato da uno dei campi collezione del germoplasma di olivo siciliano costituito nel 2004 dal Dipartimento Scienze Agrarie e Forestali dell'Università di Palermo, presso l'azienda "Campo Carboj" (Castelvetrano, TP) dell'Ente di Sviluppo Agricolo della Regione Siciliana. Il campo è stato costituito con piante di 1 anno innestate su semenzali con cloni presunti delle 8 principali cultivar siciliane, rinvenuti nel corso di un'estesa indagine, condotta per diversi anni nelle aree di elezione delle principali cultivar siciliane.

Le piante sono state poste a dimora seguendo uno schema sperimentale a blocchi randomizzati completi, utilizzando nel complesso 9 piante che sono state suddivise in tre repliche di tre piante/clone putativo. Le piante sono state poste alla distanza di 5x7 m, pari ad un investimento di 286 piante ad ettaro, ed allevati a vaso globoso. Nella medesima azienda, a circa 100 m. di distanza dal campo dove sono stati impiantati i presunti cloni, si trova anche il campo delle piante utilizzate ai fini della certificazione genetico sanitaria delle cultivar siciliane (Caruso et al., 2007). Tali piante, di circa 25 anni di età, che sono state caratterizzate dal punto di vista morfologico e bio-molecolare nel corso di precedenti studi e sono descritte nel Catalogo delle cultivar Siciliane (Caruso et al., 2007), al fine di verificare le effettive variazioni dei presunti cloni, sono state assunte come standard di riferimento. Anche per quanto riguarda le cultivar di riferimento i rilevamenti sono stati effettuati su 9 piante distribuite in campo secondo il medesimo schema sperimentale adottato per i presunti cloni.

Le osservazioni sono state condotte complessivamente su piante di 45 presunti cloni (Tab. 1). In particolare lo studio ha riguardato 10 cloni presunti di Biancolilla, 6 di Cerasuola, 8 di Moresca, 11 di Nocellara del Belice, 2 di Ogliarola Messinese e 4 di Tonda Iblea. E' stato inoltre preso in considerazione anche un presunto clone di Nocellara Messinese.

Tabella 1. Elenco delle accessioni di olivo esaminate con relativo codice identificativo (ID).

Accessione	ID	Genotipo	ID
Biancolilla_std	Biancolilla Caltabellotta fp	Moresca_5	Moresca Campo 2
Biancolilla_1	Biancolilla Altofonte	Moresca_6	Moresca p1
Biancolilla_4	Biancolilla DM	Moresca_9	Moresca di Noto
Biancolilla_5	Biancolilla Ica Palermo	Moresca_10	Moresca p3
Biancolilla_6	Biancolilla di Mezzojuso	Nocellara_Belice_std	Nocellara Belice Standard
Biancolilla_7	Biancolilla di Misilmeri	Nocellara_Belice_1	Nocellara Belice Mazara del Vallo
Biancolilla_8	Biancolilla Napoletana	Nocellara_Belice_2	Nocellara Castelvetro
Biancolilla_9	Biancolilla Pantelleria	Nocellara_Belice_3	Nocellara del Belice a
Biancolilla_10	Biancolilla Siracusana	Nocellara_Belice_4	Nocellara Belice acc. 1
Biancolilla_11	Biancolilla T	Nocellara_Belice_5	Nocellara Belice acc. 2
Biancolilla_12	Biancolilla Caltabellotta pc	Nocellara_Belice_6	Nocellara Belice acc. 3
Cerasuola_std	Cerasuola Sciacca	Nocellara_Belice_7	Nocellara Belice acc. 4
Cerasuola_1	Cerasuola G. Partanna	Nocellara_Belice_8	Nocellara Belice acc. 5
Cerasuola_3	Cerasuola Castelvetro	Nocellara_Belice_9	Nocellara Belice acc. 5 b
Cerasuola_4	Cerasuola Sciacca 1	Nocellara_Belice_10	Nocellara Belice acc. 9
Cerasuola_5	Cerasuola Sciacca 2	Nocellara_Belice_11	Nocellara Belice Partanna
Cerasuola_6	Cerasuola Cappuccia	Nocellara_Messinese_std	Nocellara Messinese
Cerasuola_7	Cerasuola Paceco	Nocellara_Messinese_1	Nocellara Messinese Spina
Giarrappa_std	Giarrappa	Ogliarola_Messinese_1	Ogliarola Messinese
Giarrappa_1	Giarrappa Pollina 1	Ogliarola_Messinese_2	Ogliarola Messinese Mistretta
Giarrappa_2	Giarrappa Pollina 3	Ogliarola_Messinese_3	Ogliarola Messinese Ricciardi
Giarrappa_3	Giarrappa Mazzarino	Tonda_iblea_std	Tonda Iblea acc. 33
Moresca_std	Moresca acc.18	Tonda_Iblea_1	Tonda Iblea acc. 10
Moresca_1	Moresca acc.6	Tonda_Iblea_2	Tonda Iblea acc.16
Moresca_2	Moresca acc. 51	Tonda_Iblea_3	Tonda Iblea acc. 24
Moresca_3	Moresca acc.19	Tonda_iblea_4	Tonda Iblea acc. 26
Moresca_4	Moresca acc.4		

2. Caratterizzazione morfologica

I *rilevamenti* sono stati effettuati nel biennio 2012-13.

Su tutte le piante dei presunti cloni di olivo e di quelle delle relative cultivar di riferimento è stata eseguita l'esame dei principali caratteri morfologici. I rilievi dei tratti bio-metrici sono stati effettuati seguendo le indicazioni di descrittori primari dell'olivo (Bottari e Spina, 1952; Barranco et al., 2000a; Bartolini et al., 2005; Manuale COI) ed integrati con la scheda riportata nel "Manuale per la Caratterizzazione Primaria delle Cultivar di Olivo del Germoplasma Siciliano" (Caruso et al., 2007). Sono stati analizzati caratteri morfologici quantitativi (es. dimensione) e qualitativi (es. forma), comprendenti variabili in scala numerica (es. lunghezza e larghezza), in scala ordinale (piccolo-medio-grande) ed in scala nominale (es. presenza-assenza).

Al fine di analizzare contemporaneamente variabili qualitative e quantitative, i dati quantitativi sono stati trasformati in scala ordinale adottando le classi suggerite da Caruso et al. (2007). Sono stati presi in considerazione 35 tratti morfologici e biometrici, in particolare, 14 caratteri morfologici relativi al frutto, 14 relativi all'endocarpo e 8 relativi alla foglia (Tab. 2; Appendice I).

I rilievi sulle foglie sono stati effettuati, nel periodo invernale, su campioni di 30 foglie adulte prelevate dalla porzione mediana di rami dell'anno inseriti su branchette fruttifere. La variabilità dei caratteri sopracitati può dipendere dalla posizione in cui le foglie sono inserite sul ramo, dalla vigoria dell'albero, dalla fase del ciclo vegetativo della pianta e dalla sua età, dalla disponibilità di luce e da molti altri fattori. Per tale motivo la modalità di prelievo appena descritta è stata eseguita in modo rigoroso.

Per quanto riguarda il frutto le osservazioni sono state eseguite su campioni di 30 drupe invaiate prelevate dalla zona intermedia dei rami fruttiferi, scelti nella porzione mediana della chioma. Anche i rilevamenti relativi all'endocarpo sono stati effettuati su campioni di 30 noccioli, derivanti dalla rimozione della polpa dei frutti utilizzati, per i rilievi sulla drupa. Come per i frutti, anche per alcune caratteristiche dei noccioli si è fatto riferimento a due posizioni, quella di massima asimmetria, che corrisponde alla parte in cui è visibile la sutura carpellare, la quale per convenzione viene chiamata posizione A, e quella che risulta dalla rotazione di 90° rispetto alla posizione precedente, che viene definita posizione B. I dati sono stati utilizzati per la costituzione di schede eliografiche, di cui si fornisce un esempio in Appendice II.

Tabella 2. Caratteri morfologici presi in esame e relative classi assegnate

Caratteri della Foglia	Classe 1	Classe 2	Classe 3	Classe 4	Classe 5
Lunghezza (mm)	corta (<5)	media (5-7)	lunga (>7)		
Larghezza (mm)	stretta (<1,2)	media (1,2-1,5)	larga (>1,5)		
Forma (Lu/La) (mm)	ellittica (<4)	ellittico lanceolata (4-6)	lanceolata (>6)		
Curvatura longitudinale	iponastica	piana	epinastica	elicoidale	
Angolo apice	molto acuto	acuto	aperto		
Angolo base	molto acuto	acuto	aperto		
Posizione larghezza max	centro-apicale	centrale	centro-basale		
Superficie fogliare (mm ²)	piccola <3	media (3-6)	elevata >6		
Caratteri del Frutto					
Peso (g)	basso (<2)	medio (2-4)	medio-alto (4,1-6)	alto (6,1-8)	molto alto (>8)
Forma (Lu/La) (mm)	sferica (<1,25)	ellittica (1,25-1,5)	allungata (>1,5)		
Lunghezza (mm)					
Larghezza (mm)					
Diametro trasversale (mm)					
Simmetria	simmetrico	Legg. Asimmetrico	asimmetrico		
Posizione diametro max	basale	centrale	apicale		
Forma apice	appuntito	subconico	arrotondato		
Forma base	arrotondata	troncata	incavata		
Umbone	presente	assente			
Presenza di lenticelle	scarse	abbondanti			
Dimensioni delle lenticelle	piccole	grandi			
Progressione invaiatura	dalla base	uniforme	dall'apice		
Caratteri					
Lunghezza (mm)					
Larghezza (mm)					
Forma (Lu/La) (mm)	sferica (<1,4)	ovale(1,4-1,8)	ellittica (1,9-2,2)	allungata (>2,2)	
Peso (g)	piccolo (<0,3)	medio (0,30-0,45)	grande (0,46-0,7)	molto grande	
Diametro trasversale (mm)					
Simmetria	simmetrica	legg. asimmetrica	asimmetrica		
Posizione diametro max	basale	centrale	apicale		
Rugosità superficie	liscia	rugosa	scabrosa		
Numero solchi fibrovasc.	basso (<7)	medio (7-10)	alto (>10)		
Distribuzione solchi	uniforme	non uniforme			
Andamento solchi	regolare	irregolare			
Forma apice	appuntito	arrotondato			
Forma base	appuntita	arrotondata	troncata		
Mucrone	presente	assente			

Analisi statistica dei dati morfologici

Nell'ambito dei 35 tratti morfologici rilevati, ne sono stati presi in considerazione 17 (Tab. 3) che sono stati sottoposti ad Analisi Multivariata Discriminante o Analisi Discriminante Canonica. Dette elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software SYSTAT10; sempre attraverso l'utilizzazione del medesimo software si è proceduto al raffronto tra i presunti cloni e le relative cultivar di riferimento. Si è inoltre proceduto alla *misclassification* con il metodo *Jackknife*.

Il dendrogramma di distanza delle cultivar e dei presunti cloni, basato su 33 caratteri morfologici e biometrici (Tab. 3) è stato costruito con il pacchetto statistico SYSTAT 10. Per la costruzione della matrice delle distanze è stato utilizzato il metodo della percentuale di discordanza, "*percent disagreement*", che presuppone l'utilizzo di variabili in scala categorica o ordinale omogenee; mentre come algoritmo di associazione dei cluster è stato utilizzato il metodo del legame completo, "*Complete Linkage Method*".

Tabella 3. Tratti morfologici in Cluster analisi e Analisi Discriminante Canonica

Carattere	Tipo variabile*	Discriminante Canonica	Cluster Analisi
Forma foglia	O	X	X
Lunghezza foglia	O	X	X
Larghezza foglia	O	X	X
Curvatura lamina fogliare	O		X
Angolo apicale foglia	O	X	X
Angolo basale foglia	O	X	X
Posiz. ampiezza max foglia	O	X	X
Area foglia	O	X	X
Forma frutto	O	X	X
Larghezza frutto	O	X	X
Lunghezza frutto	O	X	X
Diametro trasversale frutto	O	X	
Simmetria frutto	O		X
Posiz. max diametro frutto	O		X
Forma dell'apice frutto	O		X
Forma della base frutto	O		X
Umbone	B		X
Peso frutto	O	X	X
Presenza delle lenticelle frutto	B		X
Dimensione delle lenticelle	O		X
Punto di inizio dell'invaiaitura	O		X
Forma nocciolo	O	X	X
Lunghezza nocciolo	O	X	X
Larghezza nocciolo	O	X	X
Diametro trasversale nocciolo	O	X	
Simmetria nocciolo	O		X
Peso nocciolo	O	X	X
Posiz. Diam. Max nocc.	O		X
Forma della base nocciolo	O		X
Forma dell'apice nocciolo	O		X
Mucrone	B		X
Superficie nocciolo	O		X
Numeri dei solchi	O		X
Distribuzione dei solchi	O		X
Andamento dei solchi	O		X

*O =ordinale; B= binomiale

3. Caratterizzazione molecolare

Estrazione DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto da giovani foglie, prelevate dalle piante campioni e conservate a -80°C fino al momento dell'uso, seguendo il protocollo CTAB sviluppato da Doyle e Doyle (1987).

Il protocollo di estrazione è stato il seguente:

- 1) una foglia di medie dimensioni (circa 150 mg) per campione è stata trasferita in azoto liquido e subito dopo posta in un tubo da microcentrifuga da 2 ml, preghiacciato in azoto liquido, contenente all'interno 2 palline di acciaio;
- 2) dentro i 3 alloggiamenti di una fiasca di agitazione, anch'essa preghiacciata in azoto liquido, sono stati inseriti altrettanti campioni;
- 3) la fiasca, posta in un microdismembratore (Mikro-Dismembrator S. Sartorius), è stata sottoposta ad agitazione meccanica per 25", a 1800 rpm, per consentire la polverizzazione del tessuto fogliare;
- 4) 750 µl di una soluzione contenente CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) al 2% (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, EDTA pH 8 20 mM, Tris-HCl pH 8 100 mM) preriscaldata a 70°C, sono stati aggiunti a ciascun campione e dopo inversione, per miscelare il tutto, il lisato cellulare è stato incubato in un bagnetto termostatico per 3', a 70°C, mescolandolo con il vortex ad ogni minuto, per eliminare polifenoli e polisaccaridi;
- 5) 1 volume di Cloroformio-Isoamilico (24:1) è stato aggiunto al lisato, così in seguito incubato per 3', a temperatura ambiente e centrifugato a 13000 xg, per 10'.
- 6) la fase acquosa recuperata è stata sottoposta nuovamente alla fase 5);
- 7) 0,6 volumi di Isopropanolo freddo (-20°C) sono stati aggiunti alla fase acquosa. La soluzione così ottenuta, dopo agitazione manuale, è stata incubata per 5', a -20°C, e centrifugata a 13000 xg, per 5';
- 8) una volta eliminato il supernatante, il precipitato è stato lavato con 500 µl di EtOH 70% freddo, (-20°C) per eliminare eventuali sali precipitati insieme al DNA;
- 9) un'ulteriore centrifugazione a 13000 xg, per 5', ha permesso di eliminare il supernatante di etanolo ed il precipitato così separato è stato lasciato in stufa a 37°C per circa 2 h per eliminare eventuali residui di etanolo per evaporazione;
- 10) infine, il precipitato di DNA è stato risospeso in 100 µl di tampone TE 1x a pH 8 (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) e conservato a -20°C.

La valutazione quantitativa e qualitativa del DNA genomico è stata effettuata mediante spettrofotometro NANODROP ND1000. La purezza del DNA è accertata dal rapporto di assorbanza $R=A_{260}/A_{280}$ nm per le contaminazioni da proteine ed il rapporto di assorbanza $R=A_{260}/A_{230}$ nm per le contaminazioni da polifenoli e polisaccaridi.

Dopo la quantificazione del DNA è stata preparata per ogni campione una diluizione con acqua distillata pari a 20 ng/ μ l della soluzione di DNA genomico, punto di partenza per le successive reazioni di PCR e conservata a -20 °C fino a prima dell'impiego.

Amplificazione dei loci SSR mediante PCR

A partire dalle diluizioni degli estratti di DNA genomico alla concentrazione di 20 ng/ μ l sono state eseguite per ogni campione le amplificazioni PCR mediante primers fluorescenti. La reazione di amplificazione è stata realizzata in un volume finale di 8 μ l contenente: 4 μ l buffer Qiagen Multiplex PCR master mix buffer 2x (Qiagen, Crawley, UK), 2,2 μ l di acqua, 0,8 μ l di primer alla concentrazione finale di 2 μ M (Biolegio), 1 μ l di Dna genomico.

Le reazioni PCR sono state eseguire nel termociclatore 9700 GeneAmp PCR System Thermal Cycler (Applied Biosystem, USA). Lo schema termico di PCR utilizzato è il seguente: 1 ciclo di denaturazione a 94 °C per 3 min., 10 cicli touchdown da 94 °C per 30 sec (denaturazione), 60 °C (-1 °C per ogni ciclo) per 30 sec., 72 °C per 30 sec. (estensione); 25 cicli a 94 °C per 30 sec, (denaturazione), 50 °C per 30 sec (annealing), 72 °C per 30 sec.= (estensione); 1 ciclo a 72°C per 6 min; 4 °C per ∞ . Tutti gli ampliconi sono stati conservati a -20 °C in attesa di essere analizzati al sequenziatore automatico capillare.

Per l'analisi del polimorfismo genetico sono stati scelti 9 tra i marcatori molecolari SSR oggi disponibili per l'olivo (Sefc et al., 2000; Carriero et al., 2002; De la Rosa et al., 2002; Cipriani et al., 2002) che in letteratura sono risultati essere tra i più polimorfici, efficaci e affidabili per il fingerprinting.

I primer forward SSR al 5' sono stati marcati con i seguenti fluorocromi: 6-FAM, HEX, NED e PET.

I primer impiegati sono stati:

DCA 03, DCA 05, DCA 18, DCA 13 (Sefc et al., 2000);

GAPU 45, GAPU 71b, (Carriero et al., 2002);

EMO L, EMO 90 (De la Rosa et al., 2002);

UDO 43 (Cipriani et al., 2002).

Ad 1 µl di miscela degli ampliconi, ottenuti dall'amplificazione dei differenti loci SSR mediante specifiche multiplex di primer marcati con fluorocromi di diverso colore, sono stati aggiunti 8,4 µl Hi-Di formammide (Applied Biosystems, USA) e 0,6 µl di GeneScan™-500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems, USA) per un volume finale di 10 µl. Il preparato è stato incubato a 94 °C per 3 minuti, al fine di realizzare la denaturazione dei frammenti di DNA, subito posto in ghiaccio per 5 minuti ed infine sottoposto ad elettroforesi capillare.

L'identificazione degli alleli di un locus SSR per cultivar è stata eseguita per elettroforesi capillare al sequenziatore ABI-PRISM® 3130 Genetic Analyzer. La determinazione delle dimensioni alleliche in termini di paia di basi (bp) è stata realizzata per confronto dei profili elettroforetici degli ampliconi con il marcatore GeneScan™-500 LIZ® Size Standard (interno a ciascun campione) e mediante l'utilizzo del GeneMapper® Software v3.7 (Applied Biosystems, USA).

Cluster analisi

Un dendrogramma UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) di similarità genetica è stato costruito con il software PowerMarker v3.25 (Liu and Muse 2005), basato su nove loci SSR. La presenza di un allele, identificato nel profilo SSR di ciascuna cultivar, è stata identificata come classe 1 e l'assenza come classe 0. Gli individui che hanno presentato un solo allele sono stati considerati come omozigoti.

Il livello di similarità genetica tra le cultivar è stato in seguito calcolato attraverso una matrice binaria (1;0), utilizzando il coefficiente di similarità di Nei (1973). Il software PowerMarker v3.25 è stato utilizzato inoltre per calcolare il numero di alleli per locus SSR, l'eterozigosità attesa (He), l'eterozigosità osservata (Ho) e il PIC (Polymorphic Information Content).

IV. RISULTATI E DISCUSSIONE

1. Caratterizzazione morfologica

I genotipi di olivo oggetto di studio sono stati valutati per caratteri morfologici e biometrici riguardanti la foglia, il frutto e l'endocarpo, che sono ritenuti indispensabili per l'identificazione delle piante (Baldoni et al. 2011) (Tab. 3 e 4, in Sezione Materiale e Metodi).

Biancolilla

La variabilità morfologica riscontrata è stata abbastanza elevata. Per quanto concerne la foglia, tra i presunti cloni la forma prevalente è risultata quella *ellittica-lanceolata*; la lunghezza (mm) è variata tra 46.54 (clone 9) e 65.31 (clone 4); la larghezza (mm) tra 10.61 (clone 6) e 13.72 (clone 8).

Con riferimento al frutto, la forma dei cloni 7 e 9 è risultata sferica, a differenza dei rimanenti cloni e dello STD, nei quali la forma del frutto è risultata ellittica. Il peso del frutto (g) è variato tra 2.3 (clone 6) e 6.91 (clone 11), quest'ultimo è risultato *alto* rispetto a tutti gli altri, che invece rientrano nella classe di peso *medio-alto*. Larga parte dei cloni ha presentato nocciolo di forma *ellittica*, eccetto il clone 7 che ha mostrato nocciolo *ovale*. Il clone 11 ha presentato il nocciolo più grande (lunghezza = 17.98 mm; larghezza = 9.21 mm; peso = 0.82 g).

Cerasuola

La forma della foglia che ha prevalso è stata *ellittica-lanceolata*, lo STD ha invece forma *ellittica*, la lunghezza (mm) della foglia è variata tra 57.81 (clone 1) e 65.49 (clone 6); la larghezza (mm) della foglia è variata 13.73 (clone 3) e 16.9 lo STD; la forma del frutto è stata *sferica*; il peso del frutto (g) è variato tra 3.32 (clone 1) e 4.54 (clone 4). Tutti i cloni e lo STD hanno presentato nocciolo di forma *ovale*.

Giarraffa

Per quanto riguarda i presunti cloni di 'Giarraffa', la forma prevalente della foglia è stata *ellittica-lanceolata*; la lunghezza (mm) della foglia è variata da 47.49 (clone 2) e 60.88 (clone 3); la larghezza (mm) della foglia è variata da 12.06 (clone 2) e 13.78 (STD); la forma del frutto è risultata per tutti *ellittica*; il peso del frutto (g) più alto è stato riscontrato nel clone 3 (7.55) e nello STD (7.66). Tutti i presunti cloni e lo STD hanno presentato una forma del nocciolo *ellittica*; Giarraffa 3 ha presentato il nocciolo più lungo rispetto agli altri.

Moresca

Tra i presunti cloni di 'Moresca', la forma della foglia prevalente è stata *ellittica*, eccetto per il clone 1, che ha presentato forma della foglia *ellittica-lanceolata*; la lunghezza (mm) della foglia è variata tra 54.19 (clone 2) e 62.45 (clone 6); la minore larghezza (mm) della foglia l'ha presentata il clone 1 (11.71); la forma del frutto non è variata ed è risultata *ellittica*; i cloni 1 e 4 hanno presentato un peso del frutto (g) maggiore di 6; la maggior parte dei presunti cloni ha presentato una forma del nocciolo *ellittica*, eccetto il clone 1 avente forma del nocciolo allungata; inoltre la lunghezza del nocciolo per tale clone è risultata notevole, 21.31 mm.

Nocellara del Belice

Circa i cloni di Nocellara del Belice, la forma delle foglia è stata *ellittico-lanceolata*, la lunghezza (mm) della foglia è variata tra 52.15 (clone 2) e 74.85 (clone 8); la larghezza (mm) della foglia è variata 12.29 (clone 1) a 17.68 (clone 7); la forma del frutto dei cloni è stata prevalentemente *sferica*, tranne i cloni 1 e 11, che hanno forma *ellittica*; il peso del frutto (g) più elevato è stato riscontrato nel clone 10 (10.89 g), mentre il più basso nel clone 11 (3.59 g); la maggior parte dei presunti cloni ha presentato una forma del nocciolo *ovale*, eccetto i clone 1 e 11 che hanno presentato forma *ellittica*. Il clone di Nocellara del Belice 1 ha avuto il nocciolo più lungo (lunghezza = 20.29 mm).

Nocellara Messinese

Per quanto riguarda il clone 1 di Nocellara Messinese ha presentato foglia *ellittico-lanceolata*, frutto *ellittico* e nocciolo *ellittico* come lo standard. Il peso del frutto e il peso del nocciolo sono risultati di dimensioni più ridotte rispetto a STD.

Ogliarola Messinese

Tutti i presunti cloni di Ogliarola Messinese e lo STD hanno presentato forma della foglia *ellittico-lanceolata*, frutto di forma *ellittica* e nocciolo *allungato* come lo standard, tranne il clone 3, avente nocciolo *ellittico*. Lo STD ha presentato foglia di dimensioni superiori, mentre il clone 3 si è distinto per dimensioni del frutto e del nocciolo più piccoli e il clone 2 più grandi.

Tonda Iblea

I presunti cloni di Tonda Iblea si sono presentati abbastanza omogenei tra loro e lo STD per quanto riguarda tutti i caratteri morfologici. In particolare, la forma della foglia è stata *ellittica*, il frutto *sferico* e il nocciolo *ovale* (Tab. 4).

Tabella 4. Valori medi dei caratteri morfologici rilevati sulla foglia (a), sul frutto e sul nocciolo (b) delle cultivar di olivo siciliane di riferimento e di 45 presunti cloni.

a)

GENOTIPI	Forma foglia	Lunghezza foglia	Larghezza foglia	Angolo apicale foglia	Angolo basale foglia	Posizione ampiezza massima foglia	Area foglia
Biancolilla Std	4,19	49,40	11,78	2,09	2,00	2,00	425,27
Biancolilla 1	4,79	53,72	11,28	2,17	2,07	1,80	449,47
Biancolilla 4	5,14	65,31	12,79	2,59	2,41	1,62	634,42
Biancolilla 5	4,03	51,15	12,78	2,63	2,43	1,87	480,52
Biancolilla 6	4,55	47,91	10,61	2,40	2,40	1,97	380,52
Biancolilla 7	4,13	53,29	13,06	2,63	2,17	2,00	483,27
Biancolilla 8	3,83	52,25	13,72	2,79	1,21	1,76	516,11
Biancolilla 9	4,20	46,54	11,24	2,63	2,47	1,77	384,81
Biancolilla 10	3,87	49,71	12,98	2,57	2,57	1,87	475,25
Biancolilla 11	4,75	59,41	12,58	2,24	2,00	2,00	557,28
Biancolilla 12	4,79	53,72	11,28	2,03	2,00	1,07	449,47
Cerasuola std	3,54	59,07	16,90	2,79	2,45	1,83	690,81
Cerasuola 1	3,95	57,81	14,73	3,00	2,70	1,70	591,50
Cerasuola 3	4,31	58,62	13,73	2,07	2,00	1,37	554,49
Cerasuola 4	4,20	65,15	15,83	2,75	2,19	2,00	703,88
Cerasuola 5	4,18	63,10	15,30	2,30	2,00	1,63	665,73
Cerasuola 6	4,22	65,49	15,68	2,80	1,23	2,00	714,06
Cerasuola 7	4,27	59,81	14,30	2,76	2,66	1,62	606,79
Giarraffa Std	4,03	55,13	13,78	2,57	2,43	1,80	551,35
Giarraffa 1	4,08	51,81	12,89	2,80	2,00	1,23	480,15
Giarraffa 2	3,96	47,49	12,06	2,15	2,00	1,89	411,11
Giarraffa 3	5,10	60,88	12,19	2,83	1,83	2,00	514,48
Moresca Std	3,30	54,05	16,60	2,87	2,00	2,00	638,58
Moresca 1	5,28	61,22	11,71	2,90	1,17	2,00	504,90
Moresca 2	3,85	54,19	14,38	2,20	2,93	1,47	552,15
Moresca 3	3,78	62,63	16,84	3,00	2,35	2,00	743,34
Moresca 4	3,75	61,73	16,67	3,00	2,19	2,00	739,36
Moresca 5	3,55	57,01	16,19	2,53	2,17	1,77	673,19
Moresca 6	3,91	62,45	16,08	3,00	2,00	2,00	715,33
Moresca 9	3,48	58,68	16,87	2,70	2,30	1,80	712,59
Moresca 10	4,13	55,36	13,55	3,00	3,00	2,00	551,02
Nocellara Belice Std	3,82	60,28	15,89	2,62	2,45	1,66	689,17
Nocellara Belice 1	5,52	67,38	12,29	2,00	2,08	1,92	586,67
Nocellara Belice 2	3,73	52,15	14,11	1,86	1,86	2,00	515,71
Nocellara Belice 3	3,90	67,98	17,48	2,17	2,10	1,80	827,98
Nocellara Belice 4	4,43	56,04	12,82	3,00	2,00	2,00	513,90
Nocellara Belice 5	4,22	58,02	13,91	3,00	1,00	2,00	579,13
Nocellara Belice 6	4,66	59,81	13,02	3,00	2,00	2,00	549,23
Nocellara Belice 7	4,03	69,87	17,68	3,00	2,00	2,00	856,79
Nocellara Belice 8	3,96	74,85	19,07	3,00	1,60	2,00	995,32
Nocellara Belice 9	4,10	61,40	15,28	2,00	1,00	2,00	671,94
Nocellara Belice 10	4,15	61,65	14,97	2,43	2,13	2,00	642,30
Nocellara Belice 11	4,44	59,25	13,46	2,87	2,00	1,10	566,87
Nocellara Etnea Std	6,56	56,75	8,87	1,95	1,95	2,00	485,75
Nocellara messinese Std	5,73	67,55	11,92	2,50	2,29	1,68	595,81
Nocellara messinese 1	5,30	58,45	11,10	2,00	1,00	2,00	461,60
Ogliarola messinese Std	5,17	71,48	14,00	2,00	2,00	2,00	707,94
Ogliarola messinese 2	5,20	60,96	11,88	2,03	2,00	1,76	516,10
Ogliarola messinese 3	4,77	55,81	11,78	2,00	2,00	2,00	484,33
Tonda iblea Std	4,40	46,46	10,66	2,47	2,27	1,80	358,43
Tonda Iblea 1	4,57	41,48	9,25	2,13	1,87	1,57	279,61
Tonda Iblea 2	4,56	49,43	11,19	2,50	1,87	2,00	399,50
Tonda Iblea 3	3,73	50,91	13,81	2,17	2,10	1,93	493,97
Tonda Iblea 4	4,34	47,46	11,09	2,33	2,27	1,80	390,21

b)

GENOTIPI	Forma frutto	Larghezza frutto	Lunghezza frutto	Diametro trasversale frutto	Peso frutto	Forma nocciolo	Larghezza nocciolo	Lunghezza nocciolo	Diametro trasversale nocciolo	Peso nocciolo
Biancolilla Std	1,31	18,90	24,63	18,30	4,66	2,06	7,87	16,19	7,49	0,60
Biancolilla 1	1,38	17,10	23,51	16,65	4,37	2,33	7,00	16,28	6,71	0,50
Biancolilla 4	1,28	19,37	24,78	18,80	5,29	1,87	8,62	16,07	8,22	0,69
Biancolilla 5	1,36	15,51	21,01	15,01	2,76	2,03	7,33	14,87	7,06	0,45
Biancolilla 6	1,28	14,19	18,20	13,94	2,30	1,92	6,74	12,87	6,50	0,35
Biancolilla 7	1,18	14,94	17,69	14,70	2,63	1,64	6,83	11,17	6,14	0,27
Biancolilla 8	1,27	16,79	21,34	15,97	3,72	1,91	8,01	15,26	7,74	0,53
Biancolilla 9	1,17	19,44	22,74	18,94	4,92	1,91	6,74	12,80	6,50	0,35
Biancolilla 10	1,30	14,52	18,77	14,15	2,34	2,00	6,92	13,76	6,73	0,42
Biancolilla 11	1,31	21,16	27,61	20,35	6,91	1,96	9,21	17,98	8,84	0,82
Biancolilla 12	1,43	15,72	22,41	15,29	3,46	2,37	6,75	15,92	6,52	0,46
Cerasuola std	1,23	16,47	20,24	15,52	3,62	1,82	7,76	14,06	6,78	0,40
Cerasuola 1	1,19	16,57	19,65	15,51	3,32	1,60	8,16	13,00	6,92	0,43
Cerasuola 3	1,16	17,29	20,07	16,33	3,68	1,65	7,44	12,22	6,63	0,28
Cerasuola 4	1,17	18,73	21,93	18,08	4,54	1,74	8,07	14,05	7,19	0,45
Cerasuola 5	1,14	17,36	19,74	16,96	3,71	1,63	7,19	11,71	6,59	0,24
Cerasuola 6	1,15	17,19	19,70	16,90	3,64	1,57	7,39	11,56	7,08	0,28
Cerasuola 7	1,19	17,19	20,50	16,36	3,85	1,68	8,00	13,42	6,97	0,38
Giarruffa Std	1,29	21,67	27,95	20,83	7,66	1,94	9,40	18,18	8,14	0,87
Giarruffa 1	1,32	17,29	22,92	16,49	4,55	2,11	7,26	15,29	6,63	0,47
Giarruffa 2	1,41	18,01	25,41	17,43	4,83	2,24	7,61	17,04	7,15	0,56
Giarruffa 3	1,35	21,32	28,66	20,67	7,55	2,40	8,59	20,60	7,42	0,78
Moresca Std	1,30	19,82	25,81	19,36	5,85	1,91	8,72	16,60	8,22	0,73
Moresca 1	1,47	20,88	30,73	20,28	6,76	2,46	8,68	21,31	7,96	0,77
Moresca 2	1,32	20,24	26,59	19,86	5,86	1,94	8,65	16,73	8,27	0,68
Moresca 3	1,34	18,59	24,84	17,91	4,79	1,98	8,77	17,37	8,61	0,75
Moresca 4	1,37	20,40	28,02	19,71	6,08	1,91	9,52	18,23	8,90	0,79
Moresca 5	1,39	16,84	23,47	16,32	3,69	1,86	8,83	16,31	8,25	0,69
Moresca 6	1,35	18,73	25,24	18,57	4,60	1,98	8,64	17,02	8,15	0,62
Moresca 9	1,44	18,49	26,65	18,22	4,82	2,03	9,07	18,36	8,63	0,80
Moresca 10	1,27	18,87	24,03	18,43	4,42	1,86	8,49	15,78	8,17	0,59
Nocellara Belice Std	1,17	21,58	25,24	20,87	7,03	1,60	9,40	15,03	7,85	0,72
Nocellara Belice 1	1,42	22,88	32,23	21,64	9,70	2,07	9,87	20,29	8,76	1,00
Nocellara Belice 2	1,16	19,54	22,55	18,68	5,20	1,58	8,93	14,06	7,70	0,58
Nocellara Belice 3	1,16	21,41	24,87	20,51	6,98	1,66	9,37	15,50	8,09	0,77
Nocellara Belice 4	1,10	23,57	25,90	23,15	8,66	1,57	9,69	15,19	8,43	0,66
Nocellara Belice 5	1,10	21,44	23,66	21,10	6,40	1,52	8,99	13,64	7,73	0,49
Nocellara Belice 6	1,11	23,65	26,17	23,16	8,80	1,56	9,79	15,27	8,30	0,71
Nocellara Belice 7	1,10	24,29	26,66	23,58	8,82	1,48	10,49	15,48	8,58	0,84
Nocellara Belice 8	1,18	22,91	26,98	22,17	7,81	1,68	9,74	16,32	8,39	0,85
Nocellara Belice 9	1,11	22,80	25,31	21,95	7,48	1,55	9,65	14,92	8,34	0,73
Nocellara Belice 10	1,09	25,28	27,56	24,96	10,89	1,52	10,32	15,66	8,65	0,76
Nocellara Belice 11	1,44	15,64	22,54	15,15	3,59	2,17	7,73	16,78	7,18	0,59
Nocellara Etnea Std	1,30	21,88	28,48	21,39	7,73	2,20	8,17	17,92	7,90	0,69
Nocellara messinese Std	1,29	20,97	26,94	20,27	6,70	2,01	8,72	17,43	8,45	0,84
Nocellara messinese 1	1,35	16,44	22,12	15,45	3,65	2,01	8,14	16,33	7,71	0,61
Ogliarola messinese Std	1,35	18,70	25,24	18,23	5,03	2,31	7,61	17,58	7,47	0,53
Ogliarola messinese 2	1,42	20,04	28,54	19,52	6,84	2,29	8,54	19,53	7,99	0,75
Ogliarola messinese 3	1,21	17,74	21,51	17,24	3,78	1,84	7,49	13,74	7,09	0,47
Tonda iblea Std	1,19	21,19	25,18	20,12	6,91	1,58	9,27	14,64	8,06	0,74
Tonda Iblea 1	1,23	22,19	27,24	20,81	7,42	1,67	9,62	16,07	8,48	0,79
Tonda Iblea 2	1,26	20,79	26,08	19,32	6,54	1,69	8,91	14,95	7,85	0,61
Tonda Iblea 3	1,23	21,45	26,39	19,76	6,57	1,57	9,62	15,12	8,19	0,73
Tonda Iblea 4	1,25	20,83	26,02	20,32	6,47	1,65	8,87	14,61	7,94	0,66

L'analisi delle frequenze dei caratteri morfologici esaminati ha mostrato un certo grado di variabilità, eccezione fatta per la lunghezza della foglia, la larghezza del nocciolo e, soprattutto, per la forma del frutto. (Fig. 3).

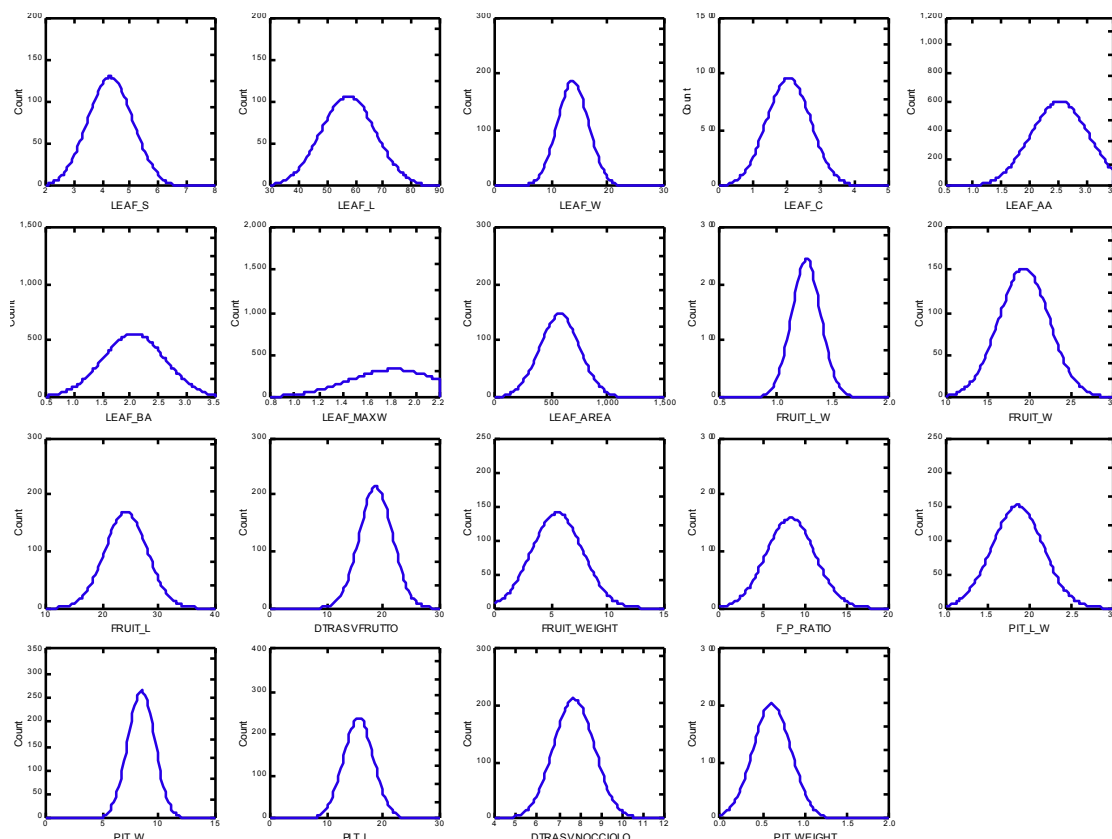


Figura 3. Distribuzione delle frequenze dei tratti morfologici esaminati per lo studio della variabilità intra-cultivar.

I dati morfologici e biometrici sono stati analizzati statisticamente, mediante analisi discriminante canonica e cluster analisi.

Analisi Discriminante Canonica

L'analisi discriminante canonica crea nuove variabili, chiamate *funzioni canoniche discriminanti*; si tratta di una combinazione lineare delle variabili originali ed è finalizzata a esaltare le differenze tra gruppi. Il metodo permette di riorganizzare le osservazioni sperimentali in uno spazio diverso, con meno dimensioni. L'analisi discriminante canonica consente di comprendere quali caratteristiche contribuiscono maggiormente alla discriminazione. I risultati relativi all'analisi discriminante canonica, basato su 18 tratti morfologici (Tab. 3 e 4) sono rappresentati nei grafici riportati nelle figure 4a-14b. La componente 1 (variabile canonica 1), riportata sull'asse X del grafico,

ha spiegato il 24% della varianza totale presente nel germoplasma studiato; la componente 2, (variabile canonica 2), riportata sull'asse Y, ha invece spiegato il 16% della varianza totale. Le componenti canoniche 3 e 4 hanno contribuito per un ulteriore 12% e 10% della varianza totale, rispettivamente (Tab. 5). Dal punto di vista statistico, la combinazione delle prime quattro variabili canoniche, che spiega il 62% della varianza totale, può essere considerata soddisfacente per interpretare i risultati sperimentali ottenuti, poiché supera il 50%. Le successive funzioni canoniche, V-XVIII, hanno contribuito a spiegare solamente il rimanente 38% della varianza totale. Nell'ambito della componente 1, i parametri con maggiore capacità discriminante sono stati: forma, larghezza e lunghezza del frutto. In particolare forma e larghezza hanno mostrato correlazione positiva; negativa la lunghezza. Per la componente 2 i parametri con maggiore capacità discriminante sono stati forma, area e lunghezza della foglia. Tale componente è stata correlata positivamente alla forma e all'area della foglia, mentre negativamente alla lunghezza della foglia. Per la componente 3, il peso del frutto e la lunghezza del nocciolo sono stati i parametri con maggiore capacità discriminante, con una correlazione positiva nel caso del peso del frutto, negativa per la lunghezza dell'endocarpo. Infine, per la componente 4 sono risultati discriminanti: lunghezza, larghezza e forma del nocciolo, peso, lunghezza, larghezza e forma del frutto (Tab. 5). La lunghezza del frutto e la lunghezza del nocciolo sono risultati positivamente correlati. Nel complesso, quindi, i caratteri con maggiore capacità discriminante sono stati quelli relativi al frutto, alla foglia e, in misura minore, al nocciolo. Tali caratteri sono, pertanto, da privilegiare nell'attività di caratterizzazione morfologica delle accessioni di olivo. Belaj et al. (2012), ai fini della caratterizzazione di genotipi di olivo selvatico hanno evidenziato l'importanza della simmetria del frutto, della forma del nocciolo, del rapporto polpa/nocciolo e del contenuto in olio. Detti tratti morfologici sarebbero infatti in grado di discriminare il 95% dei genotipi selvatici. D'Imperio et al. (2011) hanno sottolineato l'importanza dei tratti morfologici relativi al nocciolo nella discriminazione di tre cultivar di olivo e relativi mutanti somatici originarie del Molise. Modesta importanza rivestirebbero in entrambi i lavori invece le caratteristiche morfologiche della foglia. Nel presente studio i tratti che hanno assunto grande rilevanza come fonte di variabilità nelle prime quattro componenti principali sono stati parzialmente diversi rispetto a quelli rilevati da Belaj et al (2012) e D'Imperio et al. (2011). Infatti anche i parametri riguardanti la morfologia della foglia hanno rivestito notevole importanza nella discriminazione dei presunti cloni di olivo siciliani.

Diversi ricercatori tendono a non prendere in considerazione i parametri morfologici della foglia perché ritenuti altamente influenzabili dalle condizioni climatiche e ambientali. Nel contesto in cui sono state condotte le presenti prove, però, l'influenza ambientale sulla variabilità delle foglie è da escludere in quanto le piante di tutte le accessioni in studio sono allevate nello stesso campo e sottoposte alle medesime pratiche colturali. Quindi le differenze morfologiche sono sostanzialmente attribuibili alla sola componente genetica.

Tabella 5. Coefficienti canonici standardizzati delle prime quattro funzioni (componenti) canoniche discriminanti (CDF) per le 18 variabili morfologiche prese in considerazione e relativa % di varianza spiegata.

	CDF 1	CDF 2	CDF 3	CDF 4
CARATTERI				
Forma foglia	0.045	0.835	0.141	0.374
Lunghezza foglia	-0.151	-1.245	-0.679	0.210
Larghezza foglia	0.080	-0.261	-0.696	0.324
Angolo apicale foglia	0.150	-0.209	-0.361	0.060
Angolo basale foglia	-0.179	-0.155	0.109	-0.481
Posizione ampiezza massima foglia	0.157	0.088	-0.186	0.030
Area foglia	0.259	1.163	0.547	-0.384
Forma frutto	1.021	0.187	0.068	-0.909
Larghezza frutto	1.613	0.716	0.037	-1.175
Lunghezza frutto	-1.426	0.317	-0.504	1.106
Diametro trasversale frutto	0.259	0.241	-0.270	0.094
Peso frutto	0.320	0.111	1.401	-0.856
Forma nocciolo	-0.503	0.561	0.605	-0.820
Larghezza nocciolo	0.292	0.149	0.191	-1.042
Lunghezza nocciolo	0.012	-0.245	-1.062	1.364
Diametro trasversale nocciolo	-0.265	-0.105	-0.124	0.365
Peso nocciolo	-0.343	-0.596	-0.236	0.393
Varianza spiegata (%)	24.00	16.00	12.00	10.00

Biancolilla (Figure 4a e 4b)

I presunti cloni di ‘Biancolilla’ presentano un elevato grado di dispersione rispetto al genotipo standard. I presunti cloni 4, 7, 9, 11 e 12 si differenziano maggiormente lungo la componente 2, sulla quale incidono per lo più i parametri morfologici relativi alla foglia (Fig.4a); i presunti cloni 4 e 9 si differenziano anche lungo le componenti 1 e 4 (Fig. 4b), sulla quale pesano soprattutto i tratti relativi al frutto e al nocciolo; i cloni 6, 10, 11 e 12 si distinguono lungo la componente 4. Tali distribuzioni contribuiscono a spiegare le differenze morfologiche rilevate tra i diversi genotipi (Tab.4).

Cerasuola (Figure 5a e 5b)

I presunti cloni presentano un basso grado di dispersione rispetto al genotipo assunto come standard. Tuttavia, lungo le componenti 1, 2 tendono a differenziarsi i cloni 4 e 6 mentre lungo le componenti 1, 4 si contraddistinguono invece i cloni 3, 5 e 6.

Giarraffa (Figure 6a e 6b)

Tutti i tre i presunti cloni sono risultati dispersi rispetto al genotipo assunto come standard varietale, lungo le componenti 1, 2 e 4.

Moresca (Fig. 7a e 7b)

I cloni presunti 1, 5 e 10 sono risultati piuttosto dispersi rispetto allo standard. In particolare, il clone 10 ha mostrato una spiccata diversità dagli altri per tutte e tre le componenti esaminate.

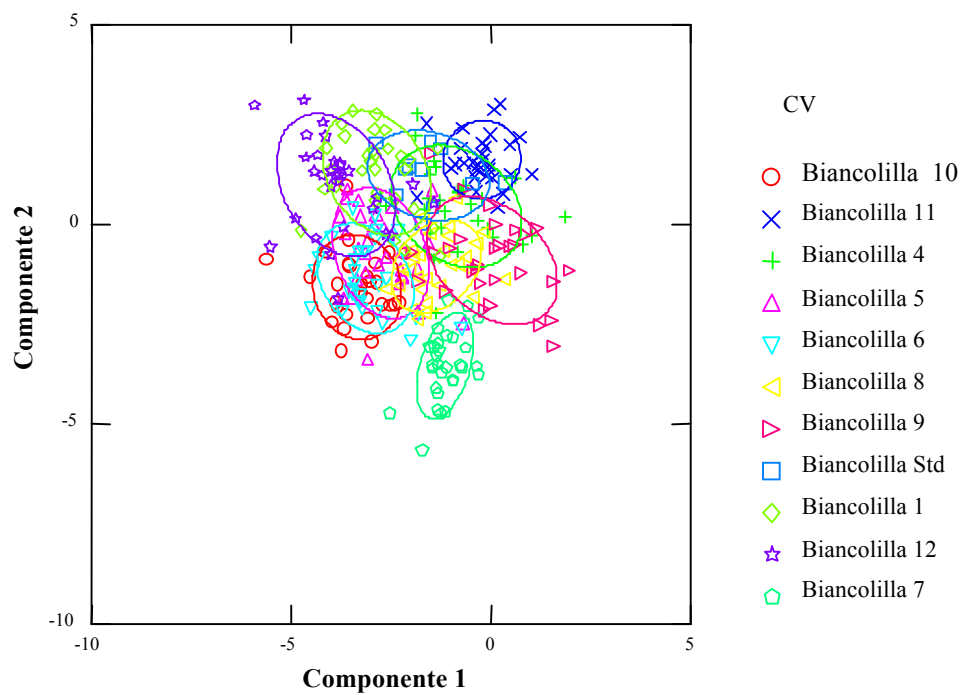


Figura 4a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Biancolilla. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

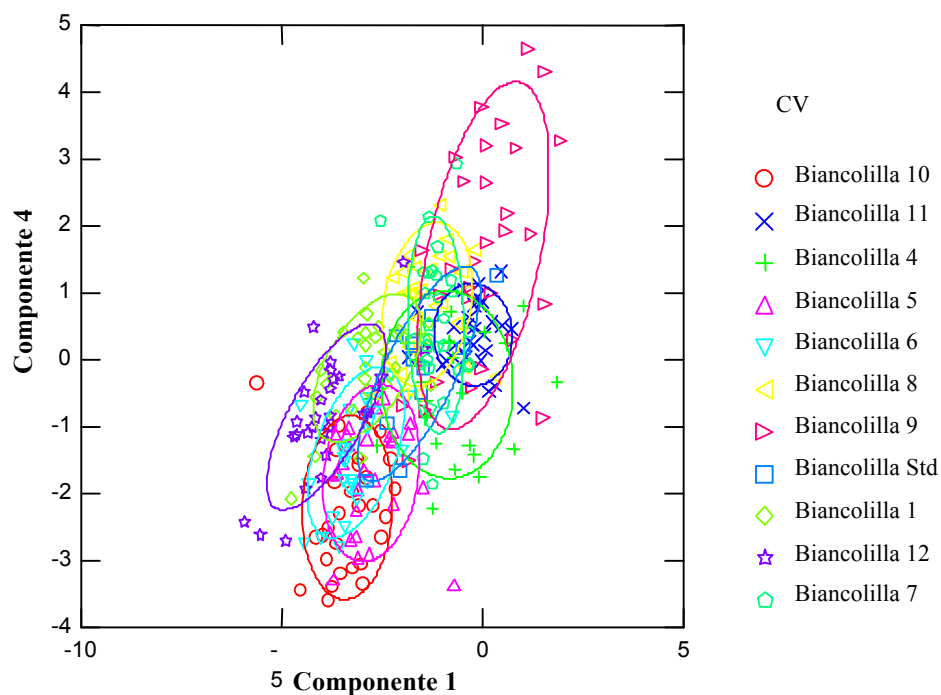


Figura 4b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Biancolilla. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

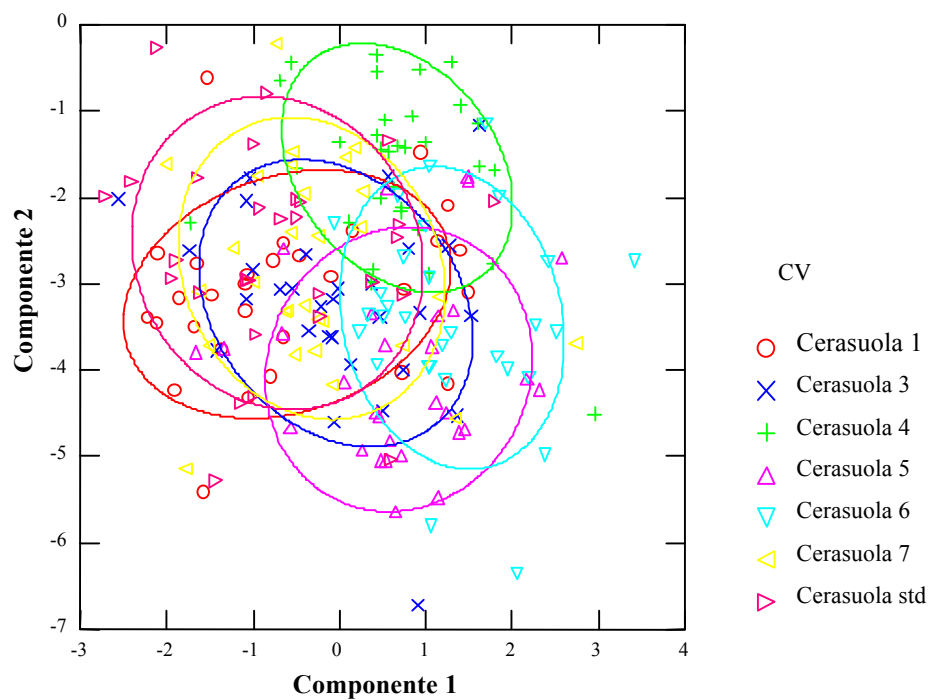


Figura 5a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Cerasuola . L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

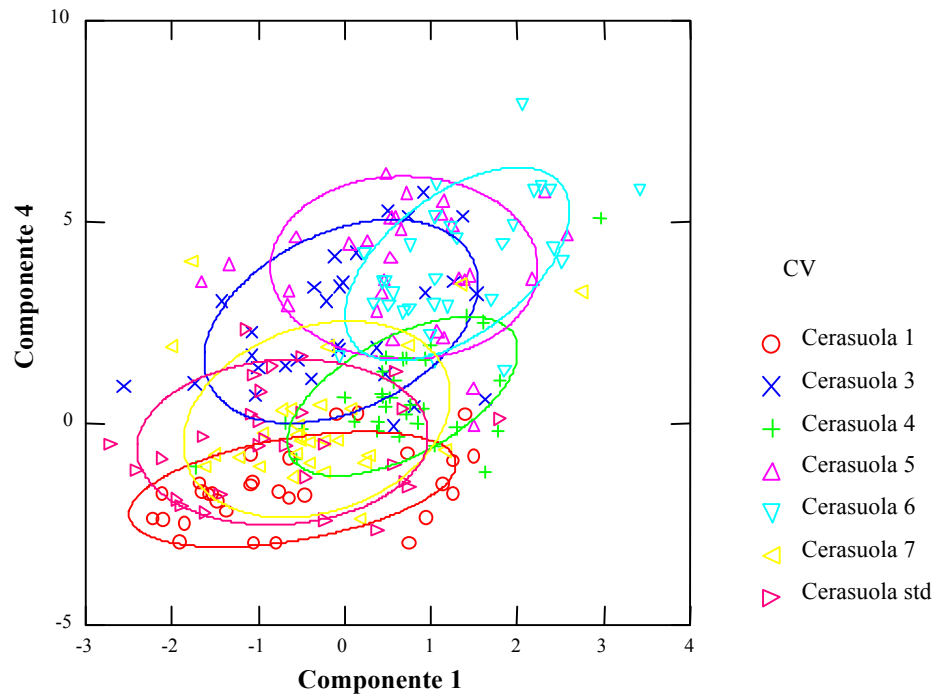


Figura 5b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Cerasuola. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

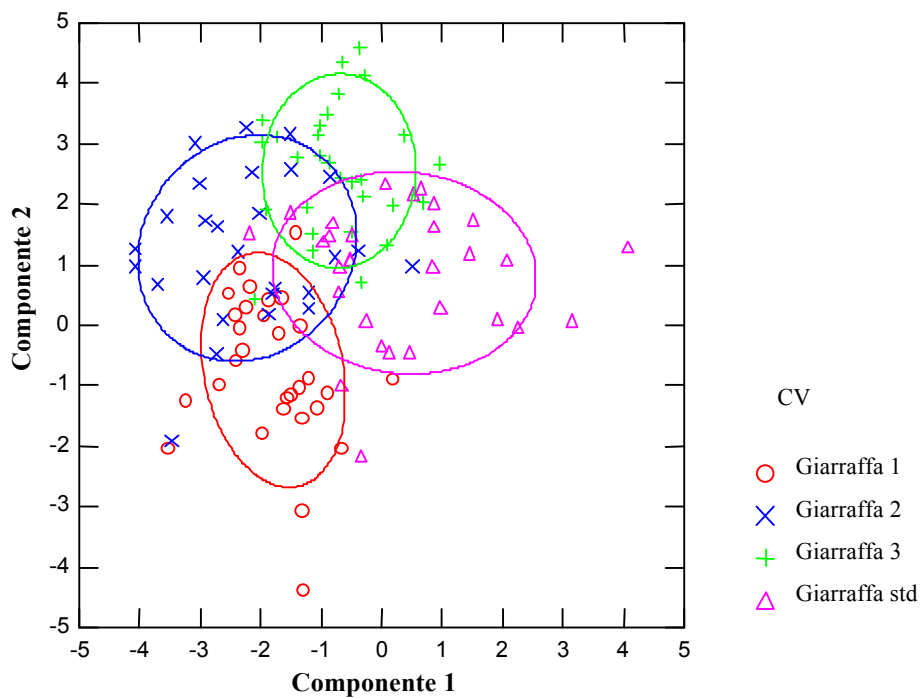


Figura 6a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Giarraffa. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

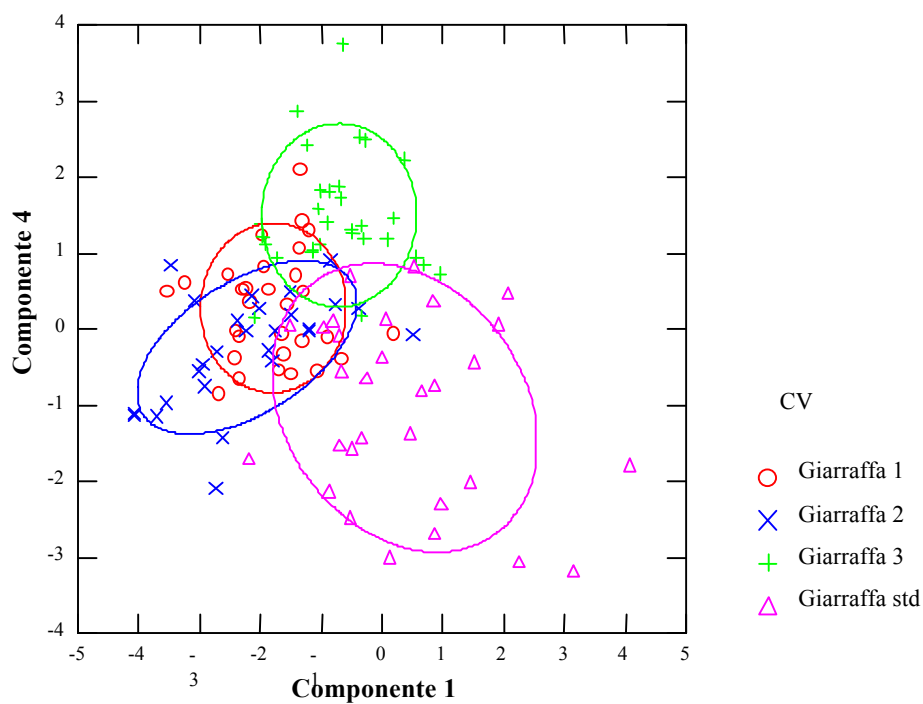


Figura 6b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Giarraffa. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

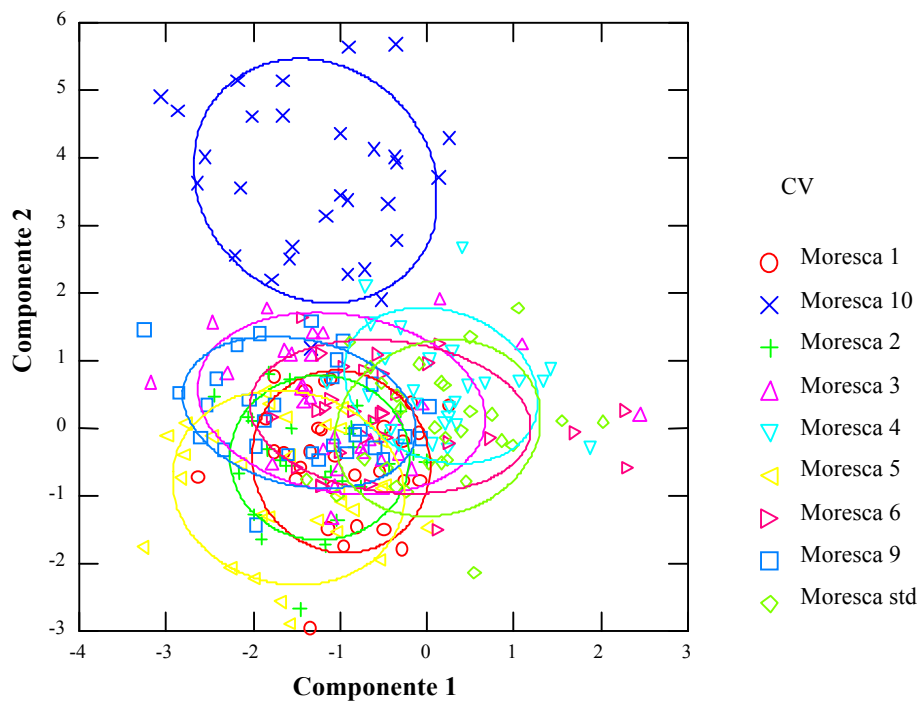


Figura 7a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Moresca. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

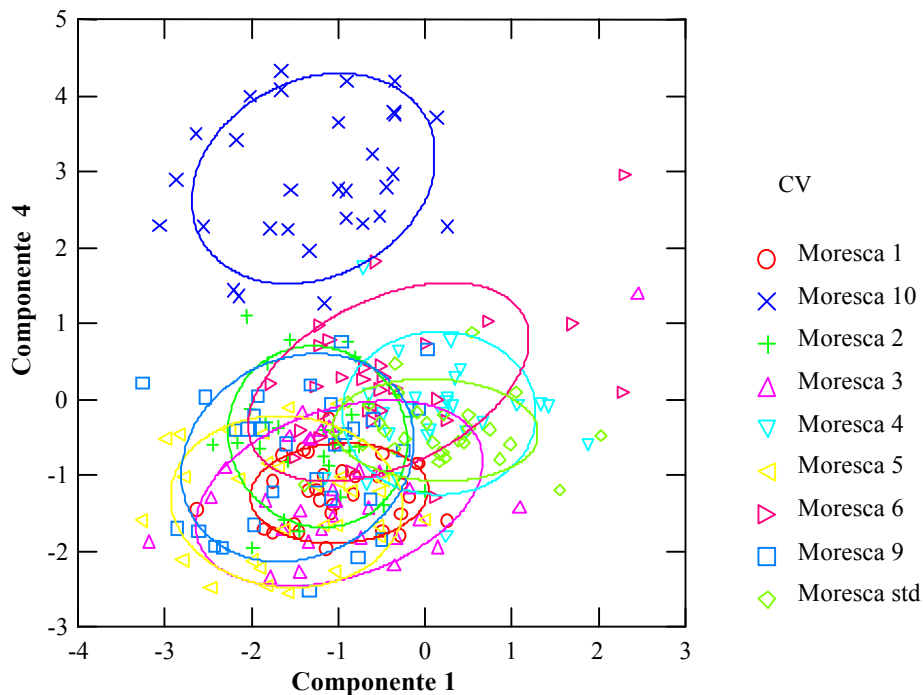


Figura 7b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Moresca. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

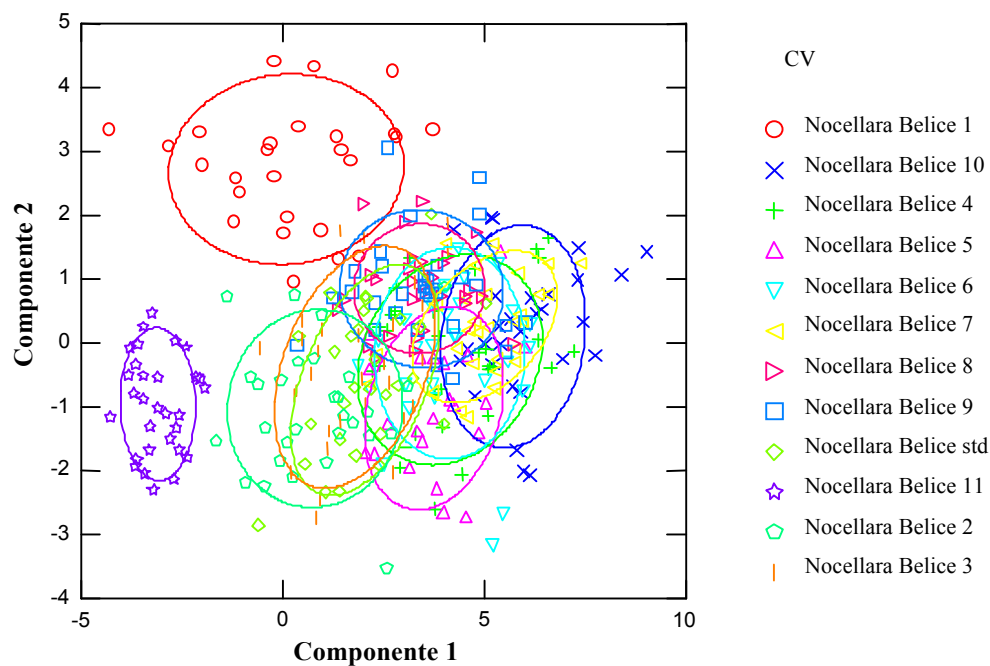


Figura 8 a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Nocellara del Belice. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

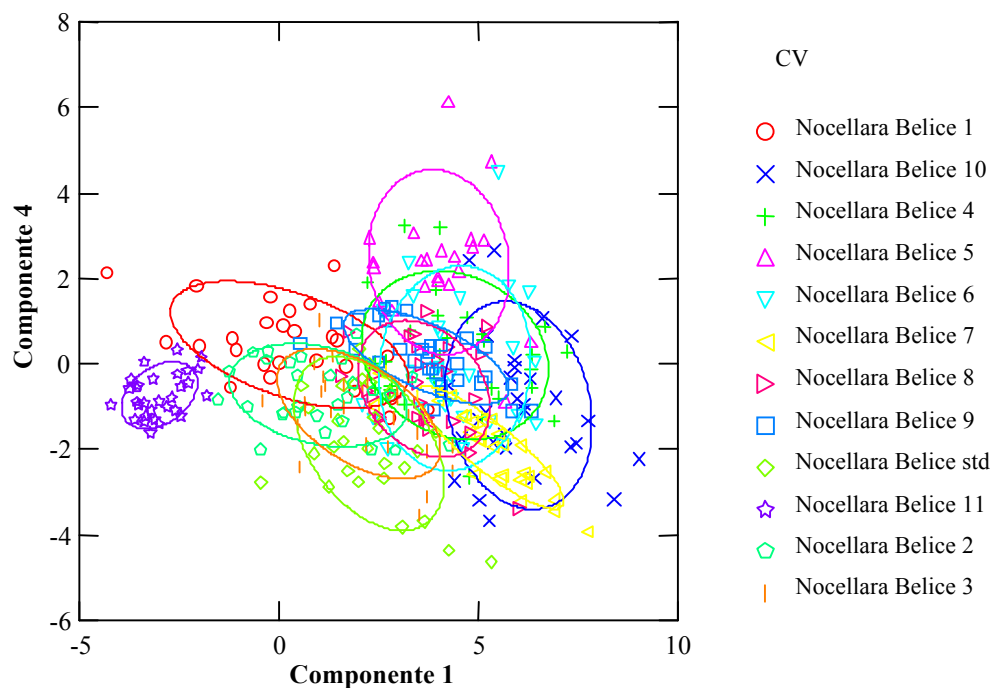


Figura 8b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Nocellara del Belice. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

Nocellara del Belice (Figura 8a e 8b)

I presunti cloni 1, 5, 10 e 11 sono risultati piuttosto dispersi rispetto al genotipo standard. In dettaglio, i cloni 1, 10 e 11 si sono separati da tutti i rimanenti lungo le componenti 1, 2 e 4. Il clone 5, si è differenziato lungo la componente 4 (Fig. 8a e 8b). Tali differenze vengono confermate anche dai dati riportati in tabella 4. Il clone 5 ha infatti presentato la lunghezza del nocciolo inferiore rispetto agli altri. Il clone 11 ha mostrato endocarpo e frutto di piccole dimensioni; il clone 1 ha invece mostrato lunghezza del nocciolo, peso del frutto e peso del nocciolo maggiori rispetto a tutti gli altri cloni. Il clone 10 ha mostrato spiccate differenze per il peso del frutto, la larghezza del nocciolo.

Nocellara Messinese (Fig. 9a e 9b)

Si rileva dispersione tra il presunto clone di ‘Nocellara Messinese’ e lo standard, lungo tutte le tre componenti.

Ogliarola Messinese (Fig. 10a e 10b)

Il presunto clone 3 si è differenziato per tutte le componenti, e ha mostrato valori dei tratti morfologici relativi a foglia, nocciolo e frutto inferiori allo STD.

Tonda Iblea (Fig. 11a e 11b)

Il clone 1 si è distinto rispetto alla componente 2; il clone 2 rispetto alla componente 4. Tutti i presunti cloni di Tonda Iblea non si sono differenziati rispetto a allo standard.

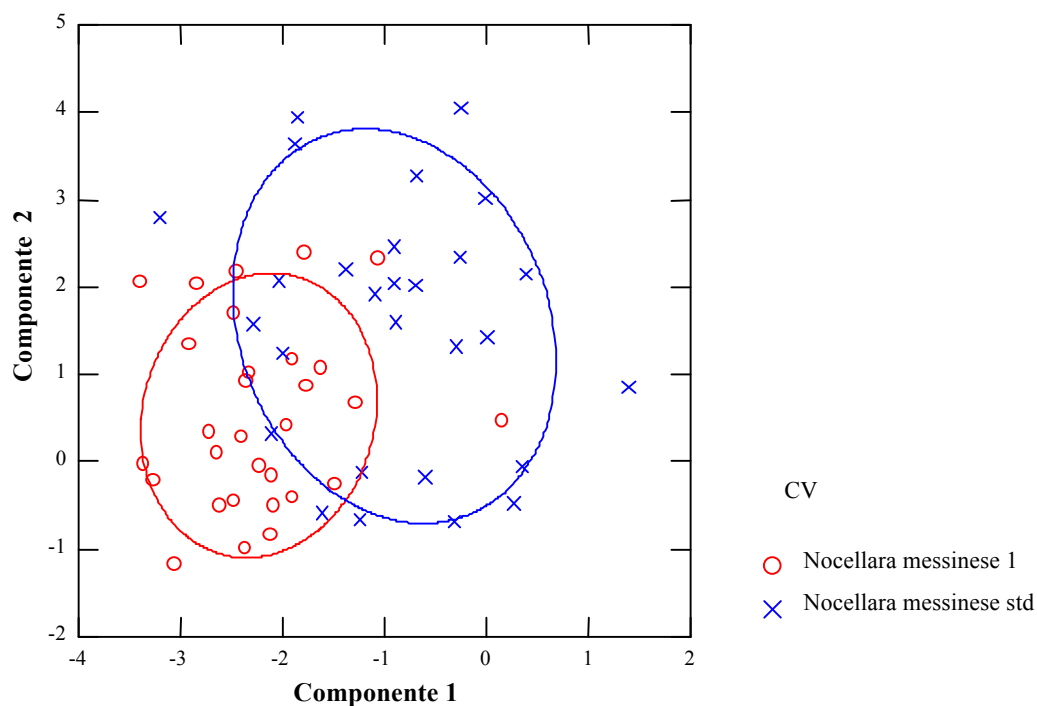


Figura 9a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 18 variabili rilevate in piante del presunto clone di Nocellara Messinese in studio. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

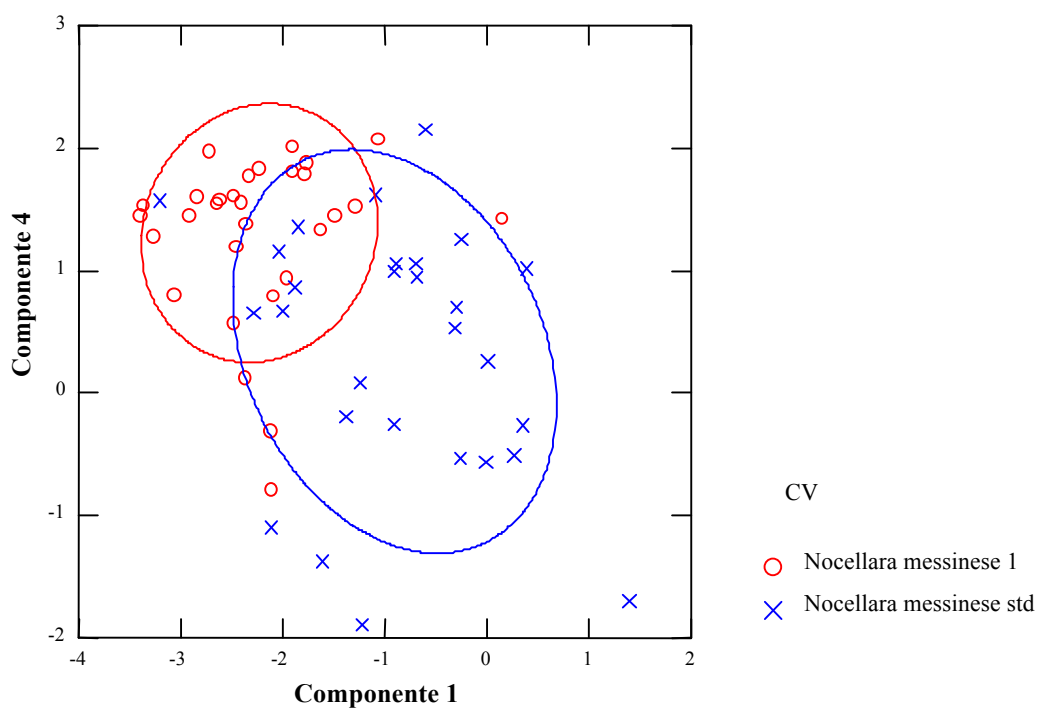


Figura 9b. Prima (componente1) e quarta (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante del presunto clone di Nocellara messinese. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

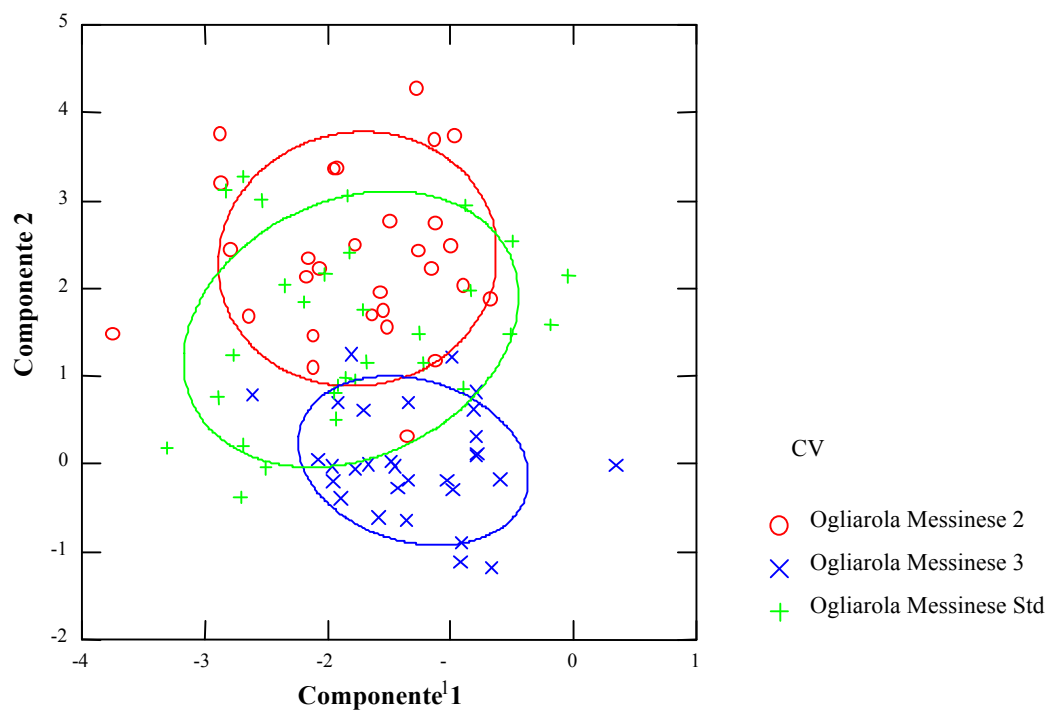


Figura 10a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Ogliarola Messinese. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

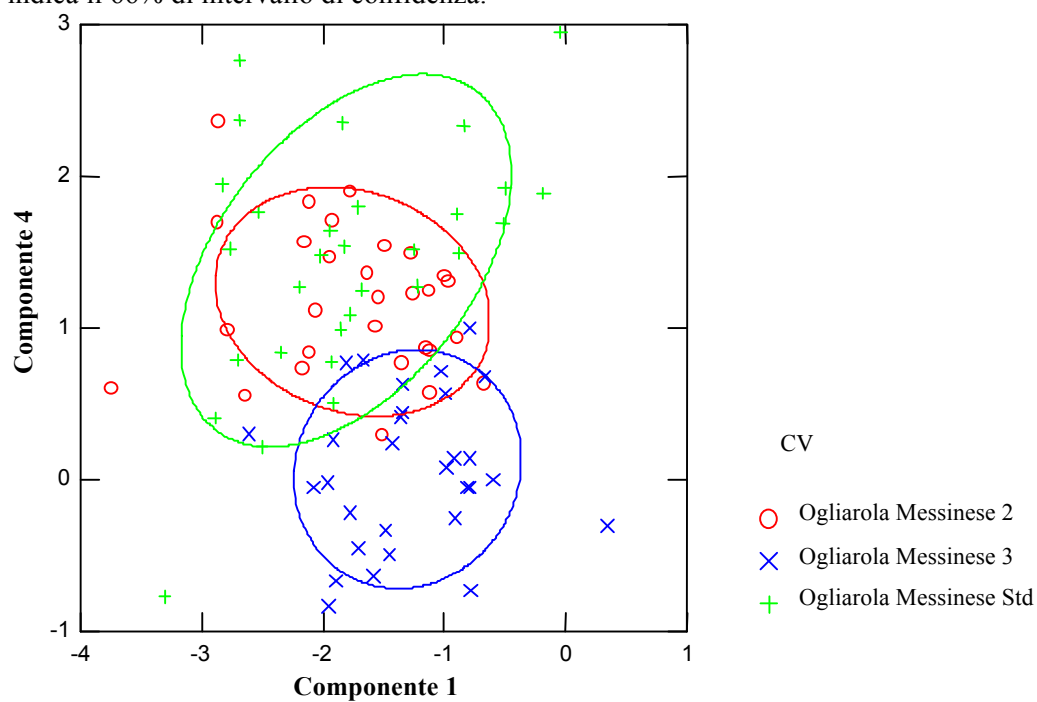


Figura 10b. Prima (componente1) e quarta (componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante di presunti clone di Ogliarola Messinese. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

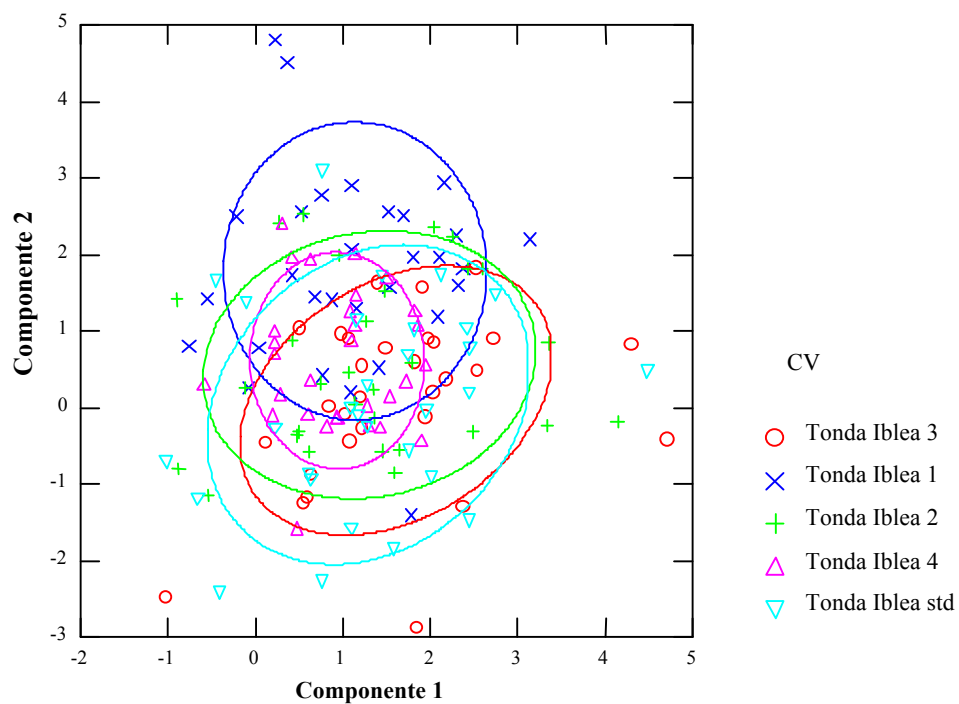


Figura 11a. Prima (componente1) e seconda (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Tonda Iblea. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

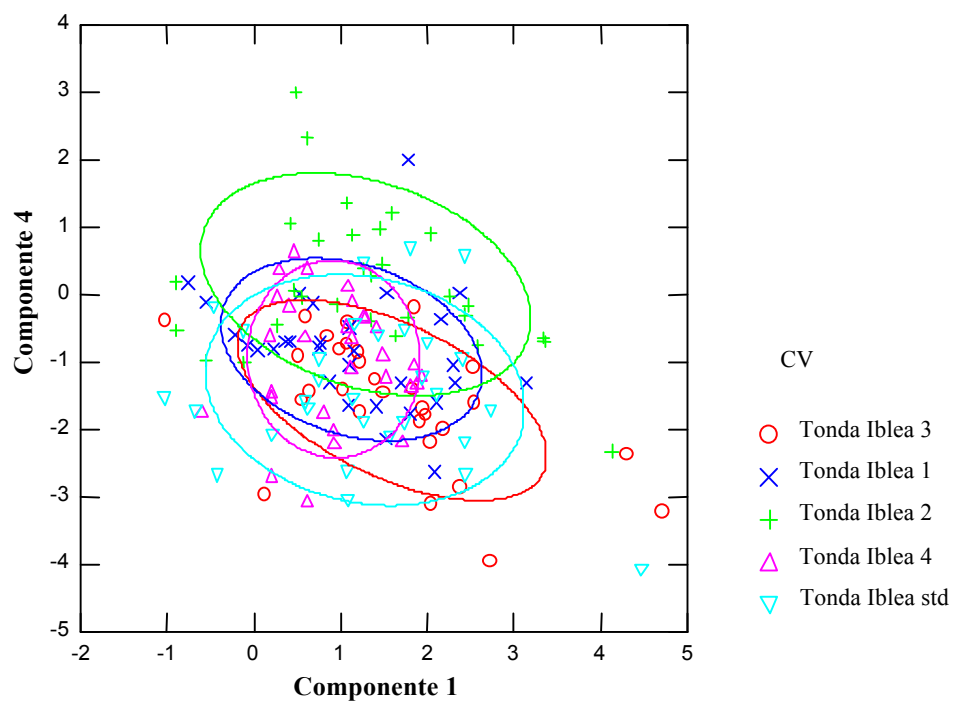


Figura 11b. Prima (componente1) e quarta (componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base di 17 variabili rilevate in piante dei presunti cloni di Tonda Iblea. L'ellisse indica il 66% di intervallo di confidenza.

Nel complesso l'Analisi Discriminante Canonica ha classificato correttamente 15 accessioni (Tab. 6), con valori superiori all'80%. Si tratta di genotipi che presentano caratteri morfologici nettamente distinti e che quindi possono essere identificati con elevato grado di precisione.

Tabella 6. Percentuale di corretta classificazione dei genotipi (matrice di classificazione metodo *Jackknife*, >80%)

GENOTIPI	(%) corretta classificazione
Biancolilla 7	87
Biancolilla 11	83
Giarraffa 3	87
Moresca std	80
Moresca 1	90
Moresca 3	80
Moresca 10	100
Nocellara Belice 11	80
Nocellara Belice 5	91
Nocellara Belice 8	87
Nocellara Belice 9	84
Nocellara Belice 10	80
Nocellara messinese 1	100
Ogliarola Messinese Std	87
Ogliarola Messinese 3	83

Analisi del dendrogramma di distanza basato su caratteri morfologici

Al fine di analizzare contemporaneamente variabili qualitative e variabili quantitative è stato costruito, utilizzando 34 caratteri morfologici, un dendrogramma di distanza (Fig. 12). I dati quantitativi sono stati trasformati in scala ordinale adottando le classi suggerite da Caruso et al. (2007). Tutti i genotipi si sono distinti a livello morfologico e la variabilità morfologica evidenziata dall'analisi dei cluster sembra più elevata rispetto a quella mostrata dall'Analisi Discriminante Canonica (ADC). Del resto, il numero di variabili prese in considerazione nella cluster analisi è notevolmente maggiore rispetto all'ADC che prende in considerazione solamente tratti quantitativi, comprendendo anche tratti qualitativi. L'analisi dei dati ha permesso di stabilire il grado di similarità/diversità delle cultivar esaminate e dei presunti cloni.

Tutti i cloni di 'Moresca' si sono raggruppati tra loro, ma, nel complesso, sono rimasti distanti dallo standard.

I cloni di Nocellara del Belice 2, 3, 7, 8 sono ricaduti nel medesimo cluster dello standard, mentre i rimanenti sono risultati distribuiti in vari cluster.

I cloni di Cerasuola più simili allo standard sono risultati i cloni 4, 5, 6 mentre quelli distinti sono stati i cloni 1, 3, 7, che hanno mostrato, sempre rispetto allo standard, numerose differenze morfologiche.

Tra i cloni di Biancolilla, i cloni 1 e 9 si sono raggruppati con lo standard, mentre i rimanenti sono ricaduti in cluster diversi.

I presunti cloni di Giarraffa sono risultati reciprocamente diversi e dallo standard, così come il clone di Nocellara Messinese. Tutti i presunti cloni di Ogliarola Messinese si sono raggruppati con lo standard.

Tra i presunti cloni di Tonda Iblea, solo per il clone 3 sono emerse differenze sostanziali dai rimanenti.

L'analisi dei cluster, prendendo in considerazione tratti morfologici quantitativi e qualitativi ha, nel complesso, mostrato maggiore variabilità rispetto all'analisi discriminante, anche se per alcuni aspetti si evidenziano maggiori difficoltà nello spiegare i risultati. Si è infatti verificato il caso della stretta somiglianza tra i genotipi, assunti come standard, di Moresca e di Giarraffa; inoltre, alcuni presunti cloni non hanno confermato le relazioni di similarità/dissimilarità messe in evidenza con dall'analisi discriminante canonica.

In effetti sono numerosi i casi segnalati in letteratura di difficoltà nell'integrare diverse metodologie di analisi statistica utilizzando i dati morfologici. Ancora maggiori le difficoltà riscontrate nell'integrare i risultati ottenuti in seguito ad analisi morfologiche/biometriche e analisi molecolari.

Cluster Tree

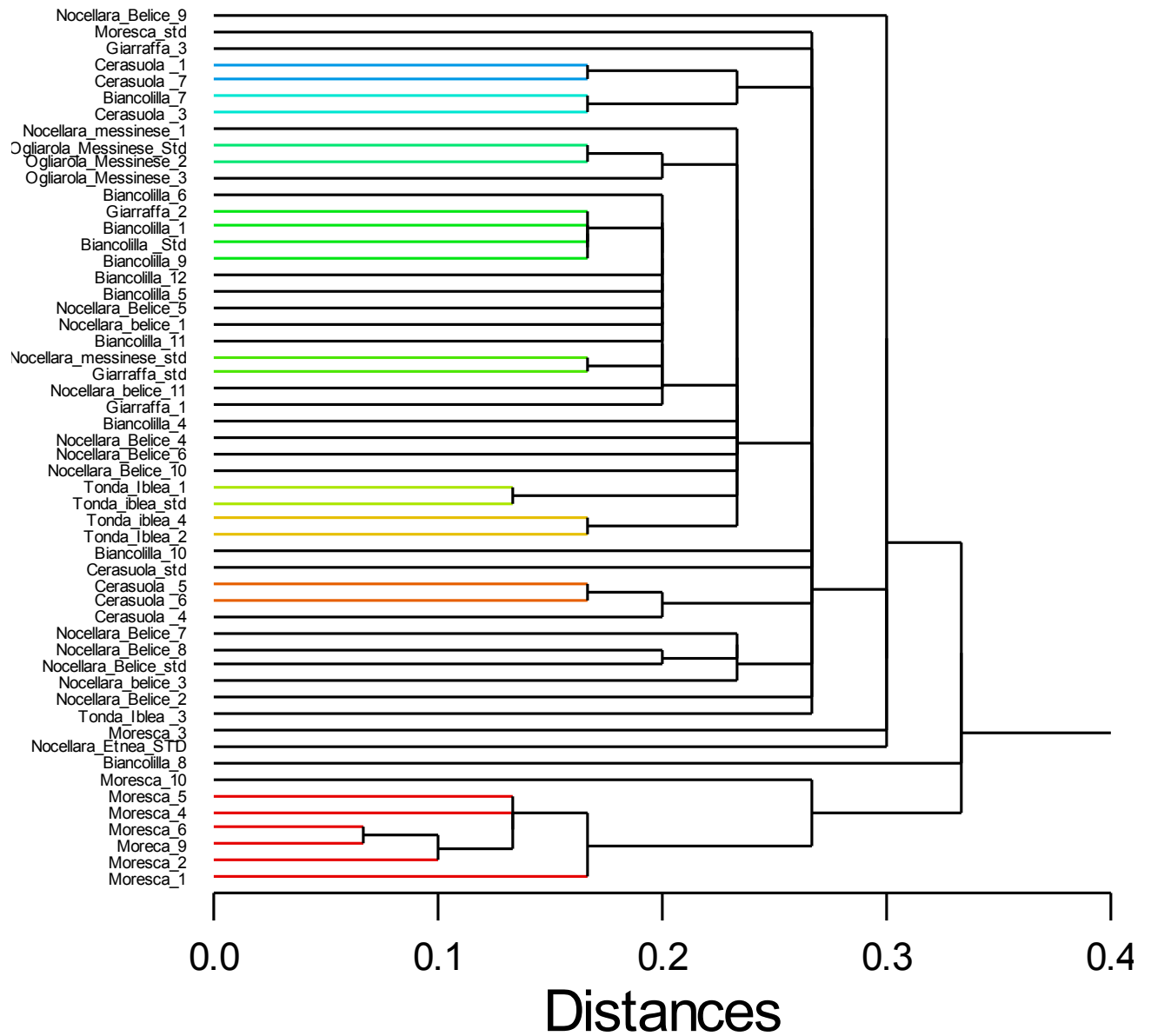


Figura 12. Dendrogramma di distanza basato su 33 tratti morfologici analizzati in nove cultivar di riferimento e 45 presunti cloni.

Caratterizzazione molecolare

Ai fini della caratterizzazione molecolare di cultivar e presunti cloni di olivo si è scelto di utilizzare i marcatori SSR considerato il loro elevato potere discriminante riportato in letteratura (Sefc et al., 2000; Cipriani et al., 2002; Carriero et al., 2002; De La Rosa et al., 2002; Diaz et al., 2006; Sabino et al., 2006; Cantini et al., 2008). In olivo, i marcatori microsatelliti sono stati applicati con successo per studiare le differenze tra genotipi di origine sconosciuta (antiche varietà) (Cipriani et al., 2002), per l'identificazione e la caratterizzazione varietale; per risolvere casi di omonimia e sinonimia (Bandelj et al., 2002; Belaj et al., 2004; La Mantia et al., 2005; Montemurro et al., 2005; Muzzalupo et al., 2009a; Sarri et al., 2006; Stambuk et al., 2007; Baldoni et al., 2009) e per la discriminazione di presunti cloni (Cipriani et al., 2002; Lopes et al., 2004; Muzzalupo et al., 2009b, 2010; Frane et al., 2010).

Nella presente indagine sono stati utilizzati i marcatori SSR raccomandati da Baldoni et al., (2009) per gli studi di variabilità nell'olivo. La maggior parte dei marcatori saggiati ha amplificato un singolo locus (DCA 03, DCA 05, DCA 18; GAPU 45, GAPU 71b; EMO L, EMO 90; UDO 43) e solo sporadicamente è stata notata l'amplificazione di extra alleli. Il primer DCA 13 in alcuni casi ha amplificato due loci. Il numero degli alleli per locus è variato da 4 con EMOL e DCA05 a 11 con UDO 43, con una media di 5.7. L'eterozigosità media è stata di 0,71 e il PIC (Polymorphic Information Content) 0,56. Tali parametri sono stati calcolati escludendo gli individui che non sono stati distinti a livello molecolare e/o quelli che hanno mostrato alleli extra (Tab. 7).

Tabella 7. Frequenza allelica, N. di alleli, eterozigosità e PIC in genotipi di 8 cultivar (standard) e di 23 presunti cloni.

Loci SSR	N. Allele	Eterozigosità attesa	Eterozigosità osservata	PIC
DCA03	6	0.81	0.96	0.78
DCA05	4	0.34	0.25	0.31
DCA18	8	0.83	0.93	0.81
Gapu45	3	0.49	0.43	0.43
GAPu71b	5	0.73	0.82	0.69
EMOL	4	0.28	0.32	0.26
EMO90	5	0.60	0.82	0.55
UDO43	11	0.81	0.93	0.78
DCA13	5	0.71	0.96	0.66
Media	5.7	0.62	0.71	0.59

L'eterozigosità osservata è variata da 0.32 con EMOL a 0.96 con DCA13 e DCA03. Il PIC è variato da 0.25 con EMOL a 0.81 per DCA18. Il primer meno polimorfico è quindi risultato EMOL.

Gli SSR hanno permesso di studiare la diversità genetica intra-cultivar, determinata da mutazioni somatiche (cultivar policlonali) oppure dalla riproduzione sessuale, scaturita da incrocio naturale e successiva disseminazione (cultivar popolazioni). Escludendo i genotipi assunti come controllo, i marcatori molecolari hanno distinto circa il 52% delle accessioni.

Le indagini effettuate hanno consentito di distinguere i genotipi originati per mutazione somatica ovvero i cloni dai siblings, (genotipi “fratelli”). Tuttavia non sempre è stato semplice interpretare se la differenza di un allele SSR sia stata determinata da una mutazione somatica o sia stata ereditata attraverso la riproduzione sessuale (origine gametica), poiché è sconosciuto il genotipo progenitore da cui tali individui possano avere avuto origine. La mutazione somatica in genere insorge in una singola cellula dell'organismo e viene trasmessa per propagazione vegetativa (innesto; auto-radicazione) dando così luogo ad un clone.

Dall'analisi del dendrogramma di similarità genetica UPGMA (Fig. 13) non è stato possibile distinguere, a livello molecolare, molti presunti cloni dalle cultivar di riferimento.

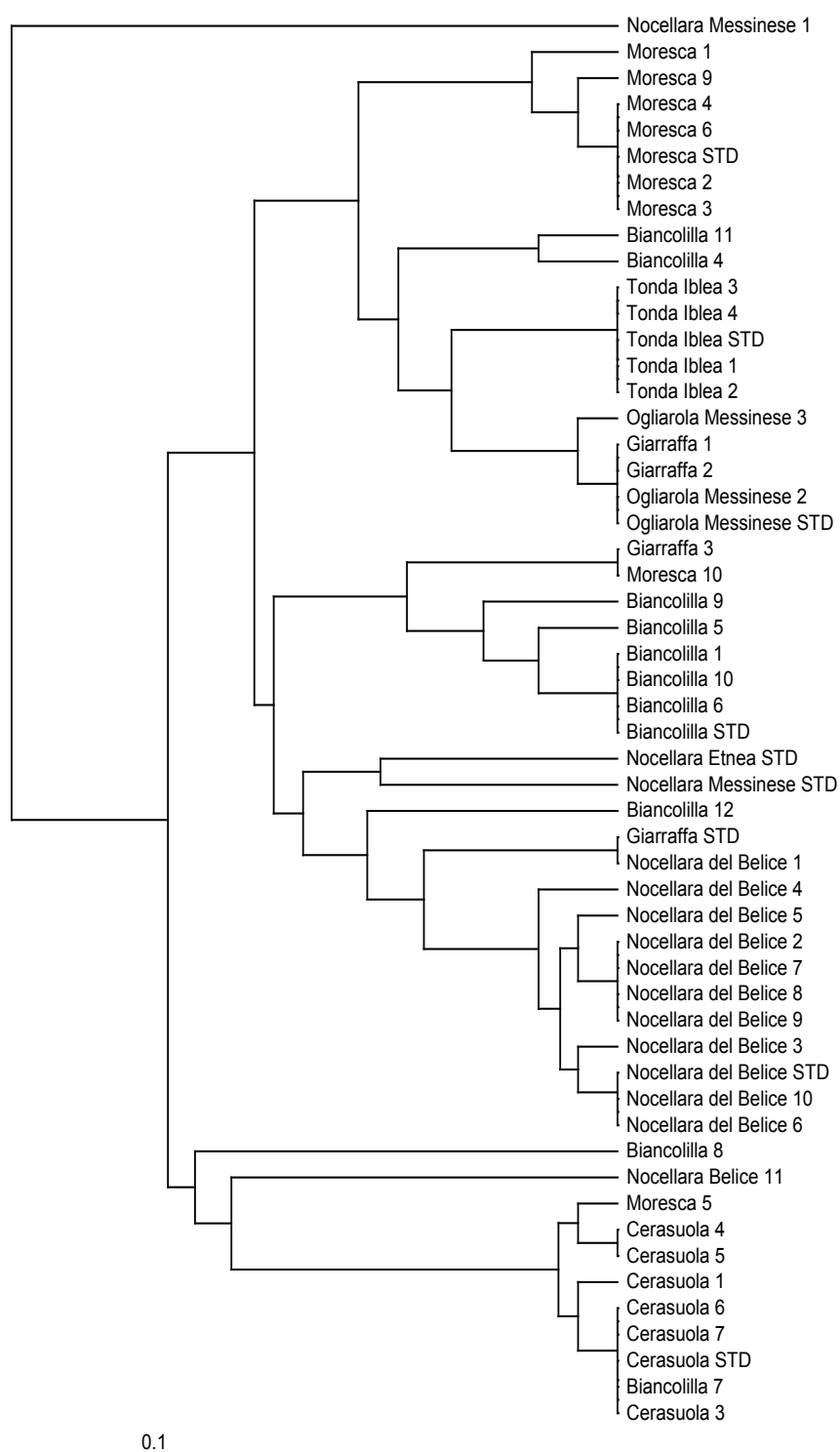


Figura 13. Dendrogramma UPGMA di similarità genetica costruito con 9 microsatelliti e utilizzando il coefficiente di Nei (1973).

È da osservare che i genotipi che costituiscono il raggruppamento 'Biancolilla' rappresentano un evidente caso di cultivar-popolazione (costituita da siblings). I presunti cloni 4 e 11 hanno mostrato relazioni genetiche molto strette e potrebbero essere dei mutanti somatici reciproci, ma sono risultati individui a se stanti rispetto alla Biancolilla STD. I presunti cloni 7, 8 e 12 hanno invece presentato strette relazioni tra loro ma non possono essere annoverati tra i siblings dello STD. I presunti cloni 1, 5, 6, 9 e 10 risultano in effetti mutanti somatici della cultivar, mentre Biancolilla 12 mostra un assetto genetico tale da farne ipotizzare un'origine da seme rispetto al genotipo assunto come standard. Eccetto Biancolilla 9, le identità molecolari dei cloni 1, 5, 6 e 10 con lo STD sono supportate anche dall'analisi discriminante canonica effettuata sui dati morfologici.

Tutti i presunti cloni di Cerasuola sono risultati essere mutanti somatici dello STD, e ciò si riflette sulla similarità morfologica, in particolare dei cloni 1 e 7, risultati decisamente molto prossimi nell'analisi discriminante canonica.

I genotipi di Giarraffa presi in considerazione risulterebbero essere dei siblings dello STD tuttavia, tale evidenza ha bisogno di ulteriori indagini per essere confermata. Sembra utile infatti rilevare che sono emerse relazioni genetiche tra i genotipi di Giarraffa oggetto del presente studio con Oglierola Messinese STD, con i cloni di Oglierola Messinese 2 e 3 e con il clone di Moresca 10. Sempre la Giarraffa STD non è stata discriminata, nel profilo SSR, dal clone 1 di Nocellara del Belice. Certamente un ampliamento del set di microsatelliti, potrebbe permettere una migliore discriminazione tra i genotipi analizzati. Non è da tuttavia da escludere che tali genotipi siano stati oggetto di errate denominazioni.

Con riferimento alla Moresca, i cloni 5 e 10 sono risultati singoli genotipi. In particolare, l'analisi ha mostrato che la Moresca 5 è, dal punto di vista biomolecolare, prossima ai cloni 4 e 5 di Cerasuola. Moresca 10 risulta invece essere un mutante somatico di Giarraffa 3. Non è da escludere che a Moresca 10 sia stata accidentalmente attribuita un'errata denominazione.

I cloni 1, 2, 3, 4, 6 e 9 sono invece mutanti somatici e la loro similarità morfologica è stata confermata da entrambe le analisi statistiche sui dati morfologici.

Con riferimento alla Nocellara del Belice, mentre i cloni 6 e 10 non si sono differenziati rispetto allo STD, tutti i cloni rimanenti hanno mostrato un moderato polimorfismo, che non ha però mai superato valori del 10%. I cloni di Nocellara del Belice 1 e 2 sono risultati siblings dello STD, mentre in tutti gli altri cloni le differenze riscontrate nel

profilo molecolare sono risultate soltanto di tipo somatico. L'analisi morfologica ha confermato la dissimilarità dei cloni 1 e 11 dallo STD ma ha anche evidenziato la diversità del clone 10 dallo STD, indistinguibili invece nel loro profilo molecolare. Emerge, pertanto che anche diversi cloni di Nocellara del Belice sono invece genotipi di una cultivar popolazione.

Per quel che riguarda i presunti cloni di Tonda Iblea, non sono emerse differenze nel profilo molecolare; a livello morfologico è stata invece riscontrata un'elevata similarità tra i cloni di Tonda Iblea, che conferma le identità trovate a livello molecolare, eccetto per i cloni 1 e 2 (Fig. 11a e 11b). Si tratta quindi di una cultivar policlonale.

Le differenze trovate per Ogliarola Messinese 3 nei confronti del suo STD sono di origine somatica.

Un altro caso di sibling si riscontra, molto verosimilmente, nella Nocellara Messinese: il clone 1 mostra una spiccata distanza genetica nel dendrogramma di similarità, confermata dall'analisi morfologica.

Dall'analisi della letteratura attualmente pubblicata, le indagini sulla caratterizzazione di varianti clonali con i marcatori microsatelliti risultano numericamente modeste. Livelli elevati di polimorfismo intra-cultivar sono stati riscontrati mediante indagini con microsatelliti nell'ambito della 'Picholine Marocaine' (Zaher et al. 2011) e delle cultivar 'Picual', 'Conserva de Elvas', 'Verde Verdelho', 'Ascolana', 'Coratina', e 'Picholine' (Lopes et al., 2004). Cloni sono stati altresì individuati nelle cultivar portoghesi 'Galeca' con marcatori RAPD e ISSR (Gemas et al., 2004) e in 'Verdeal-Transmontana' (Gomes et al., 2008).

In un recente studio, condotto con l'ausilio di marcatori RAPD e ISSR, è stato investigato il livello di variabilità genetica tra i cloni della cultivar 'Cobrançosa', provenienti da una zona geografica limitata (Martins-Lopes et al., 2009). I dati riportati nei suddetti lavori indicano un'ampia variabilità genetica intra-varietale per la presenza di numerosi cloni; è stata, inoltre, rilevata la possibilità di raggruppare i cloni in rapporto alla provenienza geografica.

A differenza della cluster analisi basata sui tratti morfologici, i risultati dell'Analisi Discriminante Canonica concordano significativamente con il clustering basato sui marcatori molecolari SSR. Per meglio comprendere le inattese identità del profilo biomolecolare osservate in 3 casi e precisamente:

a) clone1/clone2 di Giarraffa *versus* Ogliarola Messinese STD *versus* Ogliarola Messinese clone 2;

- b) Giarraffa clone3 *versus* Moresca clone10;
 c) Giarraffa STD *versus* Nocellara Belice clone1

e in particolare per verificare se tali relazioni genetiche si manifestano anche a livello morfologico, si è proceduto ad un confronto tra i suddetti genotipi attraverso l'analisi discriminante canonica.

Come si evince dai grafici 14a e 14b, l'analisi discriminante canonica riconferma le identità riscontrate su base molecolare anche a livello morfologico. Fa eccezione il presunto clone 2 di Giarraffa, aspetto che merita ulteriori approfondimenti.

In generale, sembrerebbe che per i presunti cloni di Giarraffa si siano verificati dei casi di confusione varietale e quindi di errata attribuzione del nome. Poiché infatti in Sicilia i frutti di Giarraffa, Ogliarola Messinese e Moresca, tendenzialmente di grosse dimensioni, sono in genere utilizzati come olive da mensa mature ("passuluna") il nome Giarraffa può essere stato attribuito erroneamente ad altri genotipi in funzione dell'utilizzo del frutto. Nocellara del Belice clone 1 potrebbe rappresentare un altro caso di errata attribuzione del nome, ovvero potrebbe essere un genotipo di Giarraffa il cui frutto raccolto nella fase verde è stato confuso per quello di Nocellara del Belice.

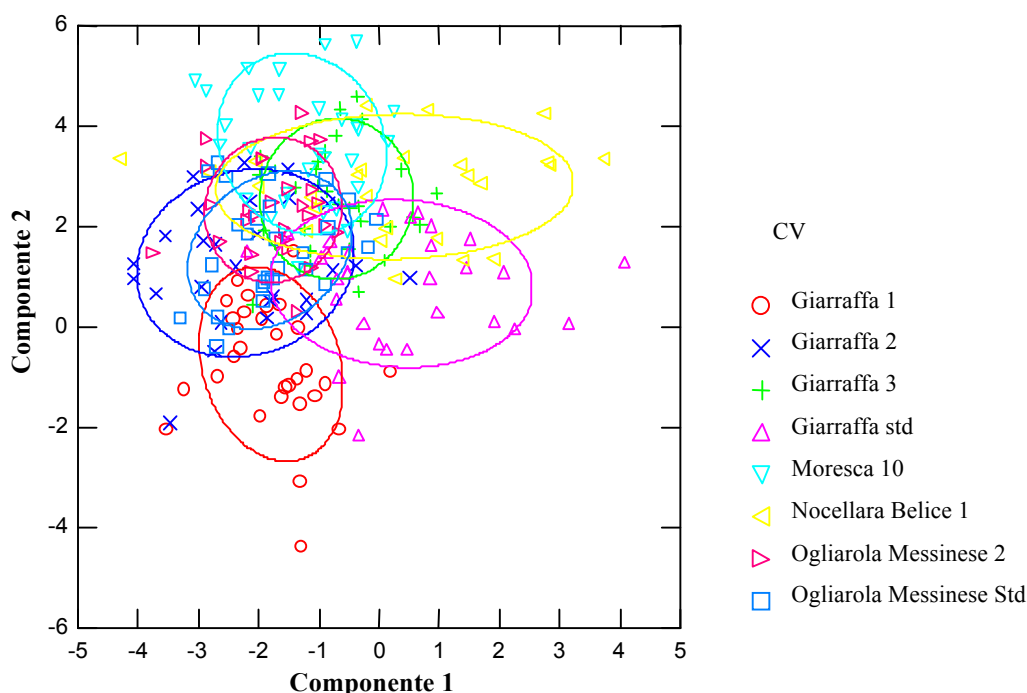


Figura 14a. Prima (Componente 1) e seconda (Componente 2) funzione discriminante calcolate sulla base della matrice di correlazione di 17 variabili osservate tra i genotipi di Giarraffa, Moresca 10, Nocellara del Belice 1, Ogliarola Messinese 2 e STD. L'ellisse indica il 66% % del livello di confidenza.

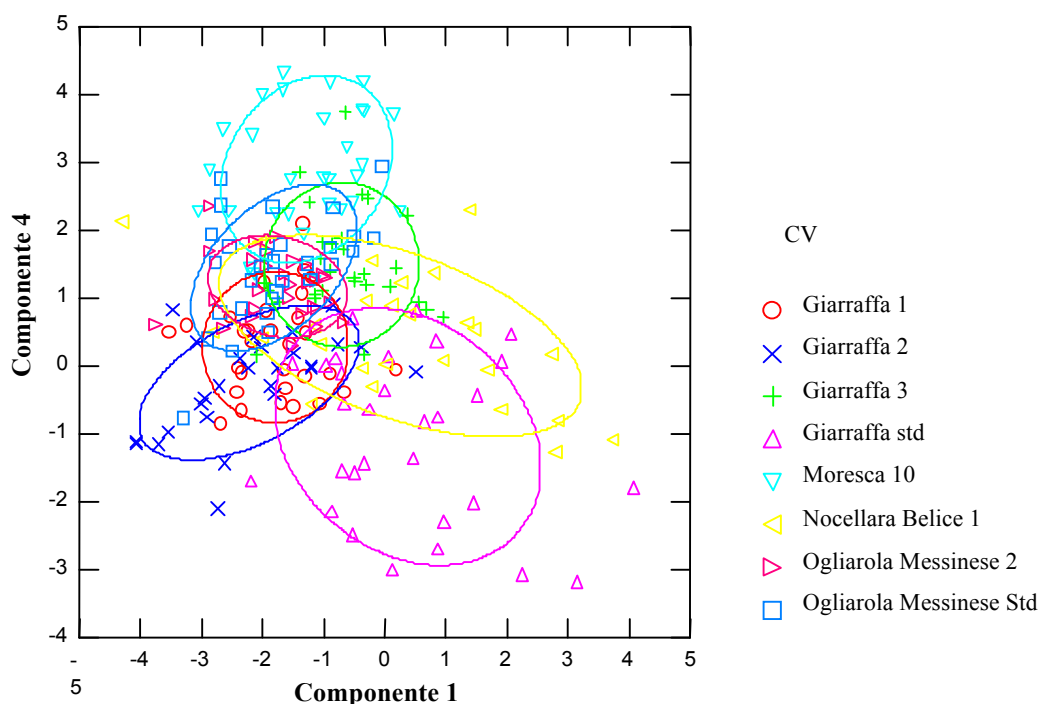


Figura 14b. Prima (Componente 1) e quarta (Componente 4) funzione discriminante calcolate sulla base della matrice di correlazione di 17 variabili osservate tra i genotipi di Giarraffa, Moresca 10, Nocellara del Belice 1, Ogliarola Messinese 2 e STD. L'ellisse indica il 66% del livello di confidenza.

L'integrazione tra diverse metodiche statistiche applicate all'analisi di dati morfologici e molecolari, non sempre permette di pervenire alle medesime conclusioni circa le relazioni di similarità tra le cultivar e i cloni anche nell'ambito del medesimo pool genetico (Bassi et al., 2002; Marra et al., 2013).

Dal complesso dei risultati scaturiti dalle indagini effettuate risulta evidente che la cluster analisi, condotta sulla base dei dati morfologici, tende ad amplificare le differenze, che non sempre corrispondono ad un'effettiva diversità della base genetica; l'Analisi Discriminante Canonica tende invece ad attenuare le differenze. La combinazione dell'ADC con la cluster analisi dei profili molecolari risulta essere la più appropriata e affidabile per le tematiche di studio affrontate. A simile conclusione erano pervenuti ad esempio Marra et al. (2013). Non è tuttavia da escludere che tali limiti potranno essere superati in futuro con l'evoluzione delle tecniche di indagine molecolare.

V. CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Dal punto di vista olivicolo, l'Italia si distingue dagli altri Paesi per l'ampio panorama varietale sul quale si basa la produzione (Bartolini et al., 1992). L'olivicoltura spagnola, per esempio, 2.5 volte superiore rispetto a quella italiana, si basa su quattro cultivar; larga parte dell'olivicoltura tunisina, la più importante del Nord Africa, su un paio di cultivar. Il 50% dell'olio prodotto in Italia si ottiene invece da almeno una ventina di cultivar. In Sicilia, in rapporto all'antica tradizione della presenza dell'olivo, alla relativa posizione nel Mediterraneo dell'Isola, e alla estrema variabilità pedoclimatica del territorio, sono ancora numerose le cultivar locali diffuse in coltura; sono infatti circa 8 le varietà sulle quali si basa larga parte della produzione oleicola dell'Isola. Nell'ambito delle suddette varietà, l'espressione di alcune caratteristiche risulta spesso non omogeneo, fenomeno che è stato spesso attribuito alla spiccata variabilità pedoclimatica del territorio.

Le indagini condotte hanno invece dimostrato che, nel complesso, le principali cultivar di olivo del germoplasma siciliano presentano una marcata diversificazione, determinata dalla differenziazione di genotipi, spesso di difficile distinzione *in situ* per la spiccata similarità morfologica, fenologica e fisiologica. Le cultivar siciliane, molto probabilmente, derivano da pool genetici con origine fortemente differenziata e sono il risultato di incroci tra cultivar locali e /o accumulo di mutazioni somatiche insorte nel tempo.

Le indagini condotte, grazie all'impiego di tecniche di biologia molecolare, consentono di affermare che i marcatori molecolari microsatelliti possono essere considerati un valido strumento per lo studio della variabilità genetica intra-varietale di *Olea europaea* L. La relativa semplicità della tecnica degli SSR rende oggi tali marcatori particolarmente adatti per le analisi di routine per l'identificazione della biodiversità all'interno di una cultivar, requisito divenuto indispensabile ai fini della certificazione vivaistica delle piante (D.M. Del 14/04/1997). Malgrado gli SSR siano una classe di marcatori molecolari molto efficaci nel rivelare polimorfismi, anche in pool genetici ristretti, e consentano di distinguere piante di una stessa cultivar (cloni) che manifestano piccole differenze nei caratteri agronomici, morfologici e qualitativi degli oli (Perri 1998; Cipriani et al., 2002; Lopes et al., 2004; Gemas et al., 2004; Gomes et al., 2008; Muzzalupo et al., 2009b, 2010; Zaher et al. 2011), in alcuni casi non sono

completamente esaustivi nell'identificazione di cloni. Quindi, con riferimento ai genotipi dei presunti cloni, non distinti con tali tecniche molecolari, sarebbe opportuno approfondire le indagini utilizzando altri marcatori molecolari come gli SNPs (Simple Nucleotide Polymorphism).

Le ricerche hanno inoltre consentito di individuare i tratti cui dare la precedenza nella fase di caratterizzazione morfologica quali: forma, larghezza e lunghezza del frutto; forma, area e lunghezza della foglia; peso del frutto; lunghezza, larghezza e forma del nocciolo. E' infine stato riscontrato che la combinazione dell'Analisi Discriminante Canonica con l'analisi dei profili molecolari risulta essere la più appropriata e affidabile per caratterizzazione della diversità intra-cultivar.

I risultati ottenuti nell'ambito di questa tesi sono utili per intraprendere la selezione di genotipi superiori rispetto allo standard attualmente disponibile, azione che implica un'attenta verifica del comportamento agronomico di ciascuno di essi.

Sempre maggiore è infatti l'attenzione oggi rivolta alla valorizzazione del germoplasma autoctono allo scopo di ottenere un prodotto finito tipico di una determinata zona geografica ed in grado di attirare il consumatore con delle caratteristiche organolettiche ben definite, che lo differenzino da altri prodotti su scala industriale. Ai fini della valorizzazione di una produzione locale non si può prescindere dalla disponibilità di materiale di propagazione vivaistico qualificato per rispondenza genetica e esente da patogeni. Si può infine affermare che la collezione *ex-situ* costituita dal Dipartimento Scienze Forestali e Agrarie dell'Università di Palermo presso il Campo Carboj dell'Ente di Sviluppo Agricolo per la Regione Sicilia può essere considerata l'unica fonte di materiale di propagazione di genotipi siciliani, standard varietali di riferimento, offrendo le garanzie di rispondenza varietale indispensabile per avviare un sistema di vivaismo certificato.

Gli operatori ed esperti della filiera produttiva olivicola, compresi quanti hanno attuato e sostenuto finanziariamente la ricerca scientifica in questo settore, possono trarre vantaggio dalla certificazione genetico-sanitaria in quanto essa valorizza l'attività di selezione dei biotipi locali, garantisce il mantenimento della tipicità della coltivazione dell'olivo, determina il miglioramento della qualità fitosanitaria delle piante; permette la tracciabilità nella moltiplicazione vivaistica, garanzia dell'identità varietale e delle produzioni oleicole.

VI BIBLIOGRAFIA

- Acevedo Coutinho L. (1956). Subsidio para o estudio cariologico de *Olea europaea* L. Genetica Iberica, 8: 3-44.
- Al Hibrahem A. (2006). Olive oil sector in Syria: the present status and perspective. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 97-108.
- Ambrosino O., Manzo M., Pugliano G., Monti L.M., Rao R. (2004). Identificazione di sinonimi ed omonimi di varietà di olivo incluse nei disciplinari DOP Campani mediante marcatori AFLP. Atti Convegno "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". Perugia, 5 Dicembre 2003.
- Angiolillo A., Pellegrini M., Mencuccini M., Baldoni L. (1998). La variabilità genetica delle cultivar di olivo evidenziata con marcatori AFLP. Atti IV Giornate Scientifiche SOI. Sanremo, 1-3 aprile: 509-510.
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldoni L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 98: 411-421.
- Armellini S. (1956). L'olivicoltura Ascolana nelle sue manifestazioni colturali odierne e future. Tipografia Ascolana, Testo Monografico, Ascoli Piceno. ASA Publ., ASA, CSSA e SSSA, Madison, WI, USA.
- Ayerza, R., Sibbett., G. S. (2001). Thermal adaptability of olive (*Olea europaea* L.) to the Arid Chaco of Argentina. Agriculture, Ecosystems & Environment, 84(3): 277-285.
- Ayoub S., Caruso T., Motisi A., Sebastiani L. (2006). The Olive Industry in Jordan. Special seminary and invited lectures. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 65-71.
- Baldini E., Scaramuzzi F. (1952). Sul valore dei dati biometrici nella descrizione e classificazione delle razze di olivo in coltura. Annali della Sperimentazione Agraria, 6: 1597-1636.
- Baldoni L., Pannelli G., Alfei B., Bandino G. (2002). Relazioni genetiche tra le varietà di olivo Bosana, Coroncina e Peranzana. Atti "Convegno Internazionale Olivicoltura", Spoleto.
- Baldoni L., Ricciolini C. Di Marco L., Germanà M.A. (2003). Variabilità e relazioni genetiche tra le varietà di olivo della Sicilia. Atti Convegno "Germoplasma olivicolo e tipicità dell'olio". 5 Dic., Perugia.

- Baldoni L., Cultrera N.G., Mariotti R., Ricciolini C., Arcioni S., Vendramin G.G., Buonamici A., Porceddu A., Sarri V., Ojeda M.A., Trujillo I., Rallo L., Belaj A., Perri E., Salimonti A., Muzzalupo I., Casagrande A., Lain O., Messina R., Testolin R. (2009). A consensus list of microsatellite markers for olive genotyping. *Molecular Breeding*, 24: 213-231.
- Baldoni L., Famiani F., Caruso T., Loconsole G., Saponari M. (2011). Progetto di ricerca Interregionale "OLVIVA", Qualificazione del vivaismo olivicolo: caratterizzazione varietale, sanitaria e innovazione nella tecnica vivaistica. Tematica I. Manuale per l'identificazione e il riordino del patrimonio varietale di olivo. ED. Università degli studi di Bari "Aldo Moro", Dipartimento di Biologia e Chimica Agroforestale ed Ambientale, pp. 1-44.
- Bandelj D., Jakše J., Javornik B. (2002). DNA fingerprinting of olive varieties by microsatellite markers. *Food Technology and Biotechnology*, 40 (3): 185-190.
- Barone E., Di Marco L., Motisi A., Caruso T. (1994). The Sicilian olive germplasm and its characterization by using statistical methods. *Acta Horticulturae*, 356: 66-69.
- Barone E., Caruso T., Marra F.P., Motisi A. (1995). Caratteristiche biometriche di 25 cultivar di olivo del germoplasma siciliano. Atti Convegno "Tecniche, norme e qualità in olivicoltura". Potenza, 15-17 dicembre 1993, pp. 623-630.
- Barranco D., Rallo L. (1984). Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía. Ministerio de Agricultura y Junta de Andalucía, Madrid, Spain, p. 387.
- Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castaneda C., Serafin F., Trujillo I. (2000a). World catalogue of olive varieties. Consejo Oleícola Internacional, Madrid.
- Barranco D., Trujillo I., Rallo P. (2000b). Are "Oblonga" and "Frantoio" olives the same cultivar? *Horticultural Science*, 35: 1323-1325.
- Barranco, D., Trujillo, I., Rallo, L. (2005), "Elaiografía hispánica" en Variedades de Olivo en España, eds. Rallo L., Barranco D., Caballero J.M. et al., Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 45-231.
- Bartolini G., Baroncelli S., Petruccelli R., Pugliesi C. (1992). La caratterizzazione varietale dell'olivo e relative problematiche. Atti Congresso "Salvaguardia e valorizzazione delle risorse genetiche", Alghero, 21-23 Sett., pp. 637-642.
- Bartolini, G., Prevost G., Messeri C. (1994). Olive tree germplasm: descriptor lists of cultivated varieties in the world. *Acta Horticulturae*, 356: 116-118.

- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G. (1999). Olive cultivar names and synonyms and collections detected in a literature review. *Acta Horticulturae*, 474: 159-162.
- Bartolini G., Prevost G., Messeri C., Carignani G. (2005). Olive Germplasm: cultivars and world-wide collections. Web site FAO: <http://apps3.fao.org/wiews/olive/oliv.jsp>
- Bartolini G., Pannelli G., Sonnoli A., Baldoni L., Servili M. (2008). Olivo (*Olea europea* L.). Scheda descrittiva varietale. Atti del “Convegno Tradizione ed Innovazione nel Miglioramento Genetico dell’Olivo”, Spoleto, 6-7 Dic., 2005. Ed. Accademia Nazionale dell’Olivo e dell’Olio, pp. 213-237.
- Bassal A. (2006). Olive Production Situation in Lebanon. Recent Advances in Olive Industry, Special seminary invited lectures, Proceeding of “Olivebioteq”, Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 89-96.
- Bassi D. (2003). Il germoplasma dell’olivo in Lombardia. Ed. Regione Lombardia-Università degli Studi, Milano, Italia.
- Beghè D. (2008). Studio sulla variabilità genetica e sulla provenienza del germoplasma di *Olea europaea* L. in Emilia. Salvaguardia della biodiversità, pp. 29-30.
- Belaj A., Satovic Z., Rallo L., Trujillo I. (2002). Genetic diversity and relationships in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections es determined by randomly amplified polymorphic DNA. *Theoretical Applied Genetics*, 105: 638-644
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 736-744.
- Belaj A., Cipriani G., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. (2004). Characterization and identification of the main Spanish and Italian olive cultivars by simple sequence repeat markers. *HortScience*, 39 (7): 1557-1561.
- Belaj A., Diez C., Satovic Z., Baldoni L., Barranco D. (2005a). Collection and study of wild olive populations in Spain by means of SSR markers. “5th International Symposium on Olive Growing, 27 Sept.-2 Oct., 2004, Izmir (Turkiye).
- Belaj A., De la Rosa R., Rallo P., Angeles Ojeda M., Diaz A., Muñoz C., Trujillo I., Baldoni L., Martin A., Barranco D., Rallo L. (2005b). Molecular markers in olive: an integrated approach. “5th International Symposium on Olive Growing”, 27 Sept.-2 Oct., Izmir (Turkiye).

- Belaj A., Dominguez-García M., Atienza S.G., Urdíroz N. M., De la Rosa R., Satovic Z., Martín A., Kilian A., Trujillo I., Valpuesta V., Del Río C. (2012). Developing a core collection of olive (*Olea europaea* L.) based on molecular markers (DArTs, SSRs, SNPs) and agronomic traits. *Tree Genetic & Genomes*, 8 (2): 365-378.
- Besnard G., Bervillé A. (2000). Multiple origins for Mediterranean olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) based upon mitochondrial DNA polymorphisms. *Life Sciences*, 323: 173-181.
- Besnard G., Baradat P., Bervillé A. (2001). Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 251-258.
- Bisignano G., Tomaino A., Lo Cascio R., Crisafi G., Uccella N., Saija A. (1999). On the *in vitro* antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51 (8): 971-4.
- Bottari V., Spina P. (1952). Le varietà di olivo coltivate in Sicilia. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 7: 937-1004.
- Bracci T., Busconi M., Fogher C., Sebastiani L. (2011). Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. *Plant Cell Reports*, 30 (4): 449-62.
- Brancadoro L., Failla O., Dosso P., Serina F. (2006). Use of satellite in precision viticulture: the Franciacorta experience. "VIth International Terroir Congress Bordeaux-Montpellier", pp. 276-279.
- Caballero J.M., Del Río C., Barranco D., Trujillo I. (2006). The olive world germplasm bank of Cordoba, Spain. *Olea*, 25: 14-19.
- Cantini C., Cimato A., Sani A. (1999). Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109: 173-181.
- Cantini C., Cimato A., Autino A., Redi A., Cresti M. (2008). Assessment of the Tuscan olive germplasm by microsatellite markers reveals genetic identities and different discrimination capacity among and within cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133 (4): 598-604.
- Carriero F., Fontanazza G., Cellini F., Giorio G. (2002). Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 301-307.
- Caruso G. (1882). Monografia dell'olivo. In G. Cantoni, *Enciclopedia Agraria Italiana*, U.T.E.T., Torino, vol. 3.5 pp. 501-680.

- Caruso T., Campisi G., Motisi A., La Mantia M., Occorso G., Testolin R. (2005). Morphological, phenological and molecular characterization of the sicilian indigenous olive (*Olea europaea sativa* L.) germplasm. "5th International Symposium on Olive Growing", 27 September - 2 October, Izmir (Turkiye).
- Caruso T., Cartabellotta D., Motisi A. et al. (2007). Cultivar di olivo siciliane. Identificazione validazione, caratterizzazione morfologica e molecolare e qualità degli oli pp. 1-202. Palermo, Italia.
- Chevalier A. (1948). L'origine de l'olivier cultivé et ses variations. *Revue Internationale de Botanique Appliquee & d'Agriculture Tropicale*, 28: 303-304.
- Cicoria M., Corbo M., D'Uva T., D'Uva T., Ruggiero A. (2000). Il germoplasma dell'olivo nel Molise. Ed. ERSa-Molise, Campobasso, Italia.
- Ciferri R. (1942). Recenti progressi negli studi botanico-agrari sull'olivo. "Convegno di Studi Olivicoli". Reale Accademia dei Georgofili, Firenze, Italia, 15-17 Mag., pp. 49-98.
- Ciferri R., Marinucci M., Morettini A. (1942). Dati preliminari per una sistematica delle razze di olivo in coltura. *L'Olivicoltore*, 1: 3-7.
- Cimato A., Cantini C., Sani G. (2001). L'olivo in Toscana: il germoplasma autoctono. Ed. ARSIA Toscana-IPSL, CNR-Regione Toscana, Firenze, Italia.
- Cipriani G., Marrazzo M.T., Marconi R., Cimato A., Testolin R. (2002). Microsatellite markers isolated in olive (*Olea europaea* L.) are suitable for individual fingerprinting and reveal polymorphism within ancient cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 223-228.
- Clemente G. (1847). Cenni sul verme dell'olivo. *Giornale di agricoltura, orticoltura, industria, commercio ed economia comunale per le provincie venete*, 5 (1): 33.
- Consolandi C., Calmieri L., Doveri S., Maestri E., Marmioli N., Reale S., Lee D., Baldoni L., Tosti N., Severgnini M., De Bellis G., Castiglioni B. (2007). Olive variety identification by ligation detection reaction in a universal array format. *Journal of Biotechnology*, 129: 565-574.
- D'Imperio M., Viscosi V., Scarano M.T., D'Andrea M., Zullo B.A., Pilla F. (2011). Integration between molecular and morphological markers for the exploitation of olive germoplasm (*Olea europaea* L.), 130 (1): 229-240.
- De la Rosa R., James C.M., Tobutt K.R. (2002). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and their transferability to other genera in the Oleaceae. *Molecular Ecology Resources*, 2: 265-267.

- Di Prima S. (1949). Primo contributo allo studio biometrico delle varietà di olivo in provincia di Bari. *Annali della Sperimentazione Agraria*, 3: 457-491.
- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P. (2005a). Development and characterization of 12 new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.). "5th International Symposium on Olive Growing", 27 Sept.-2 Oct., Izmir (Turkiye).
- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P. (2005b). Cultivar identification and elucidation of genetic relationships within the species *Olea europaea* L. using microsatellites. "5th International Symposium on Olive Growing", 27 Sept.-2 Oct., Izmir (Turkiye).
- Diaz A., De la Rosa R., Martin A., Rallo P. (2006). Development, characterization and inheritance of new microsatellites in olive (*Olea europaea* L.) and evaluation of their usefulness in cultivar identification and genetic relationship studies. *Tree Genetics and Genomes*, 2: 165-175.
- Doyle J.J., Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Fabbri A., Hormaza J.I., Polito V.S. (1995). Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Journal of the American Society Science*, 120 (3): 538 -542.
- FAO: <http://www.fao.org/biodiversity>
- Ferguson L. (2006). The Table Olive Industry in California. Recent Advances in Olive Industry. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 199-204.
- Ferrara E., Reina A., Giorgio V. (1980). Contributo alla conoscenza delle cultivar di olivo per frutti da mensa diffusi in Puglia. *Notiziario Agricolo Regionale*, 11/12: 3-9.
- Finkeldey R., Gregorius H.F. (1994). Genetic resources: selection criteria and design. In: Z.S. & H.H. Hattemer (Eds.), *Conservation and Manipulation of Genetic Resources in Forestry*, Kwang Moon Kag, Seoul, pp. 322-347.
- Fiorino P., Lombardo N. (2002). Germoplasma, materiale vivaistico e certificazione. Atti del "Convegno Internazionale di Olivicoltura", Spoleto, 22 Apr., pp. 82-90.
- Fitó M., de la Torre R., Albaladejo M.F., Khymenetz O., Marrugat J., Covas M.I., (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *375 Ann Ist super sanità*, 43 (4): 375-381.
- Flahault R. (1886). *L'Olivier*. *Annales de l'école Nationale d'Agriculture*, tome I, Montpellier, Francia.

- Fontanazza G. (2000). Olivicoltura intensiva meccanizzata, Edagricole, Bologna, Italy.
- Francolini F. (1923). Olivicoltura, pp. 332 U.T.E.T., Torino
- Frane S., Dunjia B.M., Slavko P., Zlatko C., Zlatko S., Branka J. (2010). Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Oblica detected using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. African Journal Biotechnology, 9 (20): 2880-2883.
- Ganino T., Bartolini G., Fabbri A. (2006). The classification of olive germplasm. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 81 (3): 319-334.
- Ganino T., Beghè D., Valenti S., Nisi R., Fabbri A. (2007). RAPD and SSR markers for characterization and identification of ancient cultivars of gL. in the Emilia region, Northern Italy. Genetic Resources and Crop Evolution, 54 (7): 1531-1540.
- Gemas V.J.V, Almadaniml M.C., Tenreiro R., Martins A., P. Fevereiro. (2004). Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 51: 501-511.
- Gimeno E., Fitò M., Lamuela-Raventós R.M., Castellote A.I., Covas M., Farré M., de la Torre-Boronat M.C., López-Sabater M.C. (2002). Effect of ingestion of virgin olive oil on human low density lipoprotein composition. European Journal of Clinical Nutrition, 56 (2): 114-120.
- Gomes S., Martins-Lopes P., Guedes-Pinto H. (2008). Olive Tree Genetic Resources Characterization Through Molecular Markers. Genetic Diversity in Plants, pp. 15-29. www.intechopen.com.
- Green P.S., Wickens G.E. (1989). The *Olea europaea* complex in: Kit Tan (Ed.). The Davis & Hedge Festschrift, Edinburg University Press, pp. 287-299.
- Hakim I.R., Kammoun N.G., Makhloufi E., Rebaï A. (2009). Discovery and Potential of SNP Markers in Characterization of Tunisian Olive Germplasm, Diversity, 2 (1): 17-27.
http://associazionebartola.univpm.it/attivita/relazioni_fiastra_pdf/veronesi.pdf
<http://www.olviva.it/files/La%20Certificazione%20dell'olivo%20in%20Italia.pdf>
<http://leg16.camera.it/522?tema=261&Salvaguardia+della+biodiversit%C3%A0+in+agricoltura>
- Ismaili Alaoui M. (2006). Moroccan olive oil field: current situation and development perspectives. Proceeding of “Olivebioteq”, Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 29-34.

- Jardak T. (2006). Olive industry in Tunisia. Proceeding of “Olivebioteq”, Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 35-46.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayada W.G., Hodgkin T. (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, IPGRI Technical Bulletin n. 2.
- Khadari B., Breton C., Moutier N., Roger J.P., Besnard G., Berville A., Dosba F. (2002). The use of molecular markers for germplasm management in a French olive collection. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 521-529.
- La Mantia M., Lain O., Caruso T., Testolin R. (2005). SSR-based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80 (5): 628-632.
- La Mantia M., Guerin J., Sedgley M., Barone E. (2006). Identification of olive genotypes using SSR and RAPD markers. *Proceedings OLIVEBIOTEQ Biotechnology and quality of Olive tree products around the Mediterranean basin*. pp. 9-14. Actes Editions, Rabat, Marocco.
- Labombarda P., Fontanazza G. (2002). Caratterizzazione genetica del gruppo varietale del “Moraiolo”: utilizzo dei marcatori molecolari AFLP per chiarire casi di omonimie e sinonimie. *Atti “Convegno Internazionale di Olivicoltura”*. Spoleto, 22-23 aprile: pp 406-410.
- Lavee S., Avidan N., Haskal A., Ogrodovich A. (1996). Acortamiento del periodo juvenil en los plantones de olivo obtenidos de semillas. Un instrumento para la revalorizacion de la mejora genetica. *Olivae*, 60: 33-41.
- Ledig F.T. (1986). Conservation strategies for forest gene resources. *Forest Ecology and Management*, 14: 77-90.
- Lombardo N., Perri E., Muzzalupo A., Madeo A., Godino G., Pellegrino M. (2003). Il germoplasma olivicolo calabrese. Ed. ISOI-Regione Calabria-Co.R.Ass.Ol. Cosenza, Italia.
- Lopes M.S., Mendonça D., Sefc M.K., Gil F.S., Da Camara Machado A. (2004). Genetic evidence of intra-cultivar variability within Iberian olive cultivars. *Horticultural Science*, 39: 1562-1565.
- Lopes M.S., Mendonça D., Sefc K.M., Gil F.S., Machado A. (2005). Evidence of intra-cultivar genetic variability in olive cultivars. “5th International Symposium on Olive Growing”, 27 September - 2 October, Izmir (Turkiye).
- Marinucci M. (1932). Schema di classificazione delle razze di olivo coltivate nell’Italia

meridionale. L'Olivicoltore, 24.

Marra F.P., Caruso T., Costa F., Di Vaio C., Mafrica R., Marchese A. (2013). Genetic relationships, structure and parentage simulation among the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Southern Italy revealed by SSR markers. *Tree Genetics and Genomics*, 9 (4): 916-973.

Martins-Lopes P., Gomes S., Lima-Brito J., Lopes J., Guedes-Pinto H. (2009) Assessment of clonal genetic variability in *Olea europaea* L. 'Cobrançosa' by molecular markers. *SciHortic- Amsterdam*, 123: 82-89

Medzidakis I.T., Koubouris G.C. (2006). Olive cultivation and industry in Greece. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov.

Montemurro C., Simeone R., Pasqualone A., Ferrara E., Blanco A. (2005). Genetic relationships and cultivar identification among 112 olive accessions using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80 (1): 105-110.

Morettini A. (1972). *Olivicoltura*, Ramo Editoriale degli Agricoltori, Roma, Italia.

Muzzalupo I., Stefanizzi F., Perri E. (2009a). Evaluation of olives cultivated in Southern Italy by SSR Markers. *HortScience*, 44 (2): 582-588.

Muzzalupo I., Stefanizzi F., Salimonti A., Falabella R., Perri E. (2009b). Microsatellite markers for identification of a group of Italian olive accessions. *Scientia Agricola*, 66: 685-690.

Muzzalupo I., Chiappetta A., Benincasa C., Perri E. (2010). Intra-cultivar variability of three major olive cultivars grown in different areas of central-southern Italy and studied using microsatellite markers. *Horticulturae*, 126: 324-329.

Negri V., Veronesi F. Gli agricoltori creatori e conservatori della biodiversità: rapporti tra colture e culture locali.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.

Orlandi F., Ferranti F., Romano B., Fornaciari M. (2003). Olive pollination: flowers and pollen of two cultivars of *Olea europaea*. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 31: 159-168.

Owen R.W., Giacosa W.E., Hull A., Haubner R., Spiegelhalter B., Bartsch H. (2000a). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36: 1235-1247.

- Owen R.W., Mier W. Giacosa A., Hull W.E., Spiegelhalder B., Bartsch H. (2000b). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 647-659.
- Parlati M.V., Pandolfi S. (2003). Catalogo delle principali varietà di olivo selezionate nel Lazio. Ed. Unione Europea-Regione Lazio-ARSIAL Lazio. Roma, Italia.
- Pecori R. (1891). La Cultura dell'olivo in Italia Notizie storiche, scientifiche, agrarie e industriali, Editore Mariano Ricci, Disp. 22, Testo Monografico, Firenze.
- Perri E., Parlati M.V., Palopoli A., Sirianni R., Giofriddo F. (1995). Caratterizzazione varietale in olivo (*Olea europaea* L.) mediante analisi multivariata applicata alla composizione acidica di oli monovarietali. Atti Convegno "Tecniche, norme e qualità in olivicoltura". Potenza, 15-17 dicembre 1993.
- Perri E., Parlati M.V., Palopoli A., Godino G. (1998). Valutazione di presunti cloni di olivo (*Olea europaea* L.) cv Caltabellotta, mediante marcatori RAPD. Atti "IV Giornate Scientifiche SOI", Sanremo, Italia, pp. 519-520.
- Perri E., Lombardo N., Palopoli A., Miele D. (1999). Indagine sul Germoplasma di olivo della Sicilia mediante RAPD. Atti n°13 "V Convegno Nazionale sulla Biodiversità", pp. 299-304.
- Pierce F.J., Sadler E.J. (1997). The State of Site Specific Management for Agriculture, Madison, WI: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America.
- Pinheiro A.C. (2006). Olive farming in Portugal. An Overview. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 163-171.
- Pinheiro A.C. (2006). Olive farming in Portugal. An Overview. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar", Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 163-171.
- Pugliano G., Flaminio G., Pugliano G., Pugliano M.L., Sanino G., Schiavone S., (2000). La risorsa genetica dell'olivo in Campania. Ed. Regione Campania-Giunta Regionale, pp. 9-21. Napoli.
- Rafalsky A. (2002). Applications of single nucleotide polymorphism in crop genetics. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 94-100.
- Rallo L. (2006). The olive industry in Spain. Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 151-162.

- Rallo P., Dorato G., Martin A. (2000). Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in olive trees (*Olea europaea* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 984-989.
- Ramírez-Tortosa M.C., Urbano G., López-Jurado M., López-Jurado M., Nestares T., Gómez M.C., Mir A., Ros E., Mataix J., Gil A. (1999). Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *Journal of Nutrition*, 129: 2177-83.
- Redford K.H., Richter B.D. (1999). Conservation of biodiversity in a world of use. *Conservation Biology*, 13 (6): 1246-1256.
- Resta P., Lotti C., Fanizza G., Godini A., Mariani R., Palasciano M. (2002). Use of AFLP to Characterize Apulian Olive Varieties. *Acta Horticulturae*, 586: 73-77.
- Robert P.C., Rust R.H., Larson W.E. (1993). *Proceedings of soil specific crop management: a workshop on research and development issues*.
- Rotundo A., Marone E., (2002). *Il germoplasma olivicolo lucano*. Ed. Unione Europea-Regione Basilicata-MiPAF, Potenza, Italia.
- Roussos S., Rohard C., Augur C., Perraud-Gaime I., Macarie H., LeVerge S. (2006). The olive industry in France. *Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 141-150.*
- Sabino G.F., Busconi M., Da Camara Machado A., Fogher C. (2006). Development and characterization of microsatellite loci from *Olea europaea*. *Molecular Ecology*, 6: 1275-1277.
- Sakai A., Matsumoto T., Hirai D., Niino T. (2000). Newly developed encapsulation-dehydration protocol for plant cryopreservation. *Cryo Letters*, 21: 53-62.
- Sarri V., Baldoni L., Porceddu A., Cultrera N.G.M., Contento A., Frediani M., Belaj A., Trujillo I., Cionini P.G. (2006). Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to geographically defined populations. *Genome*, 49 (12): 1606-1615.
- Savino V. (2007). La certificazione dell'olivo: aspetto tecnici e normativi. "Convegno Nazionale, Ricerca e Trasferimento delle Innovazioni Tecnologiche nel Vivaismo olivicolo", 26 Feb. 2007 - IAMB.
- Sebastiani L., d'Andria R., Motisi A., Caruso T. (2006). The olive industry outside the Mediterranean. *Proceeding of "Olivebioteq", Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 183-195.*
- Sefc K.M., Lopes M.S., Mendonca D., Rodrigues Dos Santos M., Laimer Da Camara

- Machado M., Da Camara Machado A. (2000). Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea* L.) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Molecular Ecology*, 9: 1171-1173.
- Shall S. (2006). Oliviers-en pot, au jardin et pour production. Edition Ulmer, Paris, p. 96.
- Stambuk S., Sutlovic D., Bakaric P., Petricevic S., Andelinovic S. (2007). Forensic botany: potential usefulness of microsatellite-based genotyping of Croatian olive (*Olea europaea* L.) in forensic casework. *Croatian Medical Journal*, 48: 1-7.
- Stoneham M., Goldacre M., Seagroatt V., Gill L. (2000). Olive oil, diet and colorectal cancer: an ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiology Community Health*, 54: 756-760.
- Strikic F., Bandelj D., Perica S., Cmelik Z., Satovic Z., Javornik B. (2005). Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar "Oblica" detected using AFLP markers. "5th International Symposium on Olive Growing", 27 September - 2 October, Izmir (Turkiye).
- Tavanti G. (1819). Trattato teorico-pratico completo sull'olivo. Tomo I. Ed. Piatti. Firenze, Italia.
- Templeton A.R., Robertson R.J., Brisson J., Strasburg J. (2001). Disrupting evolutionary processes: The effect of habitat fragmentation on collared lizards in the Missouri Ozarks. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 98 (10): 5426-5432.
- Terral J.F., Arnold-Simard G. (1996). Beginnings of olive cultivation in Eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Research*, 46: 176-185.
- Tombesi A., Guarella P., Di Vaio C., Toscano P. (2008). Innovazioni nella meccanizzazione della raccolta e della potatura e ristrutturazione degli impianti olivicoli, Atti del "Convegno Internazionale: Ricerca ed innovazione per la filiera olivicolo - olearia dei Paesi del Mediterraneo" - Progetto RIOM, AGRILEVANTE.
- Tournefort J.P., (1719). Institutiones rei herbariae. Ex Typographia Regia, Parisiis.
- Tous Marti J., Romero Aroca A. (1993). Variedades del olivo. Ed. Fundacion "la Caixa", Barcelona.
- Vavilov N.I. (1951). Phytogeographic basis of plant breeding. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica*, 13: 1-366.
- Verhagen J., Bouma J., (1997). Modeling soil variability. In: The state of site specific management for agriculture, ed. Pierce F.J., Sadler E.J., pp. 55-67.

- Vignal A., Milan D., SanCristobal M., Eggen A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics, Selection, Evolution*, 34 (3): 275-305.
- Visioli F., Bogani P., Grande S., Galli C. (2004). Olive oil and oxidative stress. *Grasas y Aceites*, 66 Vol. 55(1): 66-75.
- Zafer Can H., Isfendiyaroglu M. (2006). Olive oil sector in Turkey. Proceeding of “Olivebioteq”, Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 109-119.
- Zaher H., Boulouha B., Baaziz M., Sikaoui L., Gaboun F., Sripada M. (2011). Morphological and genetic diversity in olive (*Olea europaea* subsp. *europaea* L.) clones and varieties. *Plant Omics Journal*, 4 (7): 370-376.
- Zeinanloo A.A. (2006). The Olive Industry in Iran. Proceeding of “Olivebioteq”, Second International Seminar, Mazara del Vallo-Marsala (TP), Italy, 5-10 Nov., pp. 173-181.
- Zito F. (1934). L’esame biometrico del nocciolo delle olive come base complementare di classificazione di varietà. *L’Olivicoltore*, 32.
- Zohary D., Spiegel-Roy P. (1975). Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, 187: 319-327.
- Zohary D., Hopf M. (1994). *Domestication of Plants in the Old World*, 2nd ed. Oxford Clarendon Press, pp. 137-142.

APPENDICE I

Foglia adulta

Le osservazioni morfologiche sulle foglie devono essere effettuate, preferibilmente, nel periodo invernale. Si raccomanda di utilizzare, per le osservazioni, campioni di 30 foglie prelevate dalla porzione mediana di rami dell'anno, inseriti su branchette fruttifere.

Lunghezza "L" (cm)

riferita al solo lembo fogliare

Corta $L < 5,0$ ☐

Media $L 5,0-7,0$ ☐

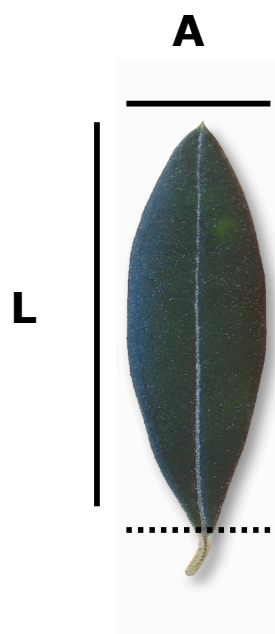
Lunga $L > 7,0$ ☐

Larghezza "A" (cm)

Stretta $A < 1,2$ ☐

Media $A 1,2- 1,5$ ☐

Larga $A > 1,5$ ☐



Forma

definita in base al rapporto “Lunghezza /Larghezza”.

- | | | |
|---------------------------------|-----------------|--------------------------|
| 1 - Ellittica | $L/A < 4$ | <input type="checkbox"/> |
| 2 - Ellittico-lanceolata | $L/A \quad 4-6$ | <input type="checkbox"/> |
| 3 - Lanceolata | $L/A > 6$ | <input type="checkbox"/> |



1
(Moresca)



2
(Cerasuola)



3
(Giarraffa)

Curvatura longitudinale lamina fogliare

1 - Iponastica ☐

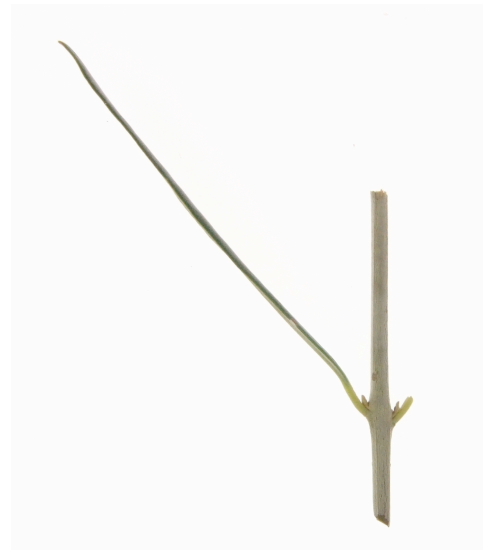
2 - Piana ☐

3 - Epinastica ☐

4 - Elicoidale ☐



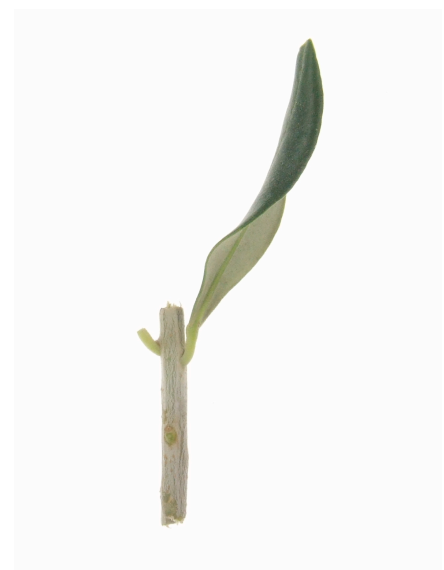
1



2



3



4

Angolo apicale

1 - Molto acuto ☐

2 - Acuto ☐

3 - Aperto ☐



1

(Giarraffa)



2

(Minuta)



3

(Santagatese)

Angolo basale

1 - Molto acuto ☐

2 - Acuto ☐

3 - Aperto ☐



1

(Nerba)



2

(Lumiaru)



3

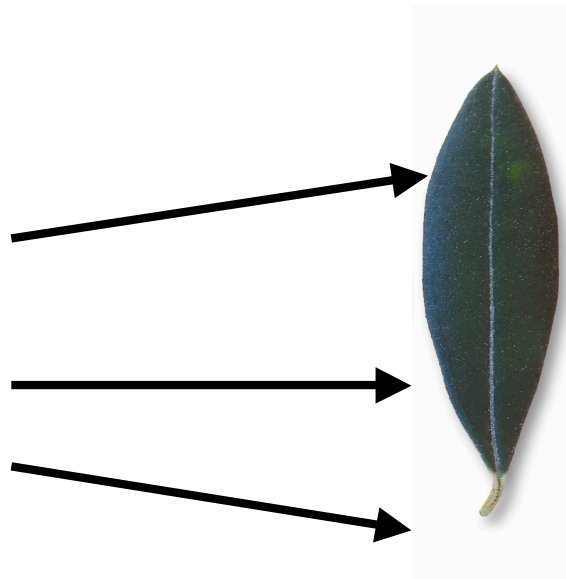
(Minuta)

Posizione ampiezza massima

1 - Centro-apicale ☐

2 - Centrale ☐

3 - Centro-basale ☐



Superficie fogliare (cm²)

1 – Piccola <3 ☐

2 – Media 3-6 ☐

3 – Elevata <6 ☐

Frutto

I rilievi vanno condotti su 30 frutti presi dalla zona intermedia dei rami fruttiferi scelti casualmente nella porzione mediana della chioma.

Peso frutto (g)

Basso < 2 ☐

Medio 2 - 4 ☐

Medio-alto 4,1 -6,0 ☐

Alto 6,1 – 8,0 ☐

Molto alto > 8,0 ☐

Lunghezza (L)

Larghezza max (A)

A

Lunghezza polare (cm) _____

Larghezza (cm) _____

L



Forma

1 - Sferica $L/A < 1,25$ ☐

2 - Ellittica $L/A 1,25 - 1,50$ ☐

3 - Allungata $L/A > 1,50$ ☐



1

(Nocellara del Belice)



2

(Nocellara messinese)



3

(Nerba)

Simmetria

1 - Simmetrico ☐

2 - Leggermente asimmetrico ☐

3 - Asimmetrico ☐



1

(Tonda ibIea)



2

(Santagatese)



3

(Olivo di Mandanici)

Posizione diametro massimo

1 - Basale ☐

2 - Centrale ☐

3 - Apicale ☐



1

(Giarrappa)



2

(Nocellara messinese)



3

(Cerasuola)

Forma dell'apice

1 - Appuntito ☐

2 - Subconico ☐

3 - Arrotondato ☐



1

(Bottone di gallo)



2

(Brandofino)



3

(Nocellara del Belice)

Forma della base

1 - Arrotondato ☐

2 - Troncato ☐

3 - Incavato ☐



1

(Giarraffa)



2

(Nasitana)



3

(Nocellara del Belice)

Umbone

1 - Presente ☐

2 - Assente ☐



1

(Brandofino)



2

(Cerasuola)

Presenza di lenticelle nel frutto (verde)

Scarse ☐

Abbondanti ☐

Dimensioni delle lenticelle

Piccole ☐

Grandi ☐

Punto d'inizio invaiatura (quando sul frutto, appaiono le prime macchie violacee)

1 - Dalla base ☐

2 – Uniforme ☐

3 - Dall'apice ☐



1

(Ogliarola messinese)



2

(Minuta)



3

(Nocellara messinese)

Endocarpo

Valutato su un campione di 30 noccioli. la posizione e' quella di massima asimmetria ed e' quello nella quale la sutura carpellare e' visibile dall'osservatore.

Peso nocciolo (g) _____

Piccolo < 0,30 ☐

Medio 0,30 – 0,45 ☐

Gronde 0,46 - 0,70 ☐

Molto gronde > 0,70 ☐

Lunghezza polare (Lu) (mm)

Larghezza (La) (mm)

Forma

1 - Sferica Lu/La < 1,4 ☐

2 - Ovale Lu/La 1,4 - 1,8 ☐

3 - Ellittica Lu/La 1,9 - 2,2 ☐

4 - Allungata Lu/La > 2,2 ☐



1

(cultivar non riscontrata)



2

(Nocellara del Belice)



3

(Moresca)

4

(Nerba)

Simmetria

1 – Simmetrico ☐

2 - Leggermente asimmetrico ☐

3 – Asimmetrico ☐



1

(Nocellara messinese)



2

(Lumiario)



3

(Oливо di Mandanici)

Posizione diametro massimo

1 – Basale ☐

2 – Centrale ☐

3 – Apicale ☐



1

(non riscontrata)



2

(Giarraffa)

3

(Brandofino)

Superficie (indica la scabrosità della superficie dell'endocarpo)

1 – Liscia ☐

2 – Rugosa ☐

3 – Scabrosa ☐



1

(Nasitana)



2

(Nocellara etnea)



3

(Giarraffa)

Numero di solchi fibrovascolari (Osservati dal punto di inserzione del peduncolo)

Basso < 7 ☐

Medio 7 -10 ☐

Alto > 10 ☐

Distribuzione solchi

Uniforme ☐

Non Uniforme ☐

Linea di sutura

Evidente ☐

Non Evidente ☐

Forma della sezione trasversale massima

Circolare ☐

Ellittica ☐

Forma dell'apice

1 – Appuntito ☐

2 – Arrotondalo ☐



1

(Nerba)



2

(Nocellara messinese)

Forma della base

1 – Appuntito ☐

2 – Arrotondato ☐

3 – Troncato ☐



1

(Nerba)



2

(Calatina)



3

(Nocellara del Belice)

Mucrone

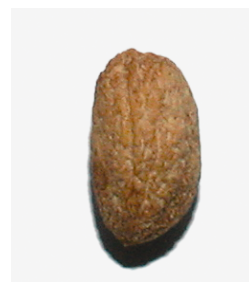
1 – Presente ☐

2 – Assente ☐



1

(Giarraffa)



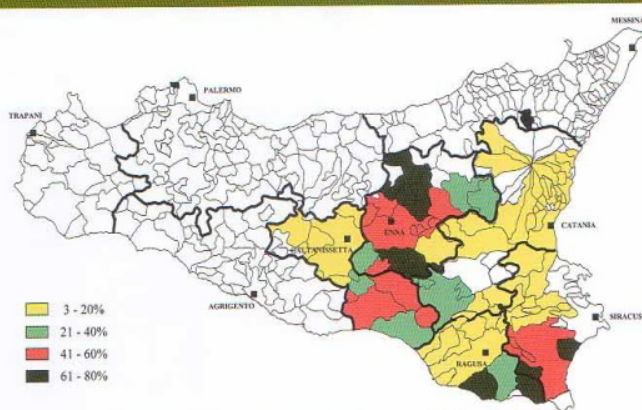
2

(Tonda iblea)

APPENDICE II



Moresca



N.B. LE PERCENTUALI INDICATE SONO RIFERITE ALL'INCIDENZA DELLA CULTIVAR SUL COMPLESSIVO PATRIMONIO VARIETALE DI OGNI SINGOLA AREA COMUNALE



Moresca

Informazioni generali

Cultivar estesamente coltivata nel Ragusano, dove rientra nell'ambito delle varietà ammesse per la produzione degli oli a DOP "Monti Iblei". Oltre che per l'olio, frutti della cultivar vengono utilizzati per il consumo diretto "in nero" ed "in verde". Caratteristica è la maturazione estremamente precoce e scalare.

Resa in olio *Media*

Rapporto polpa/nocciolo *Ottimo* ($5,7 \pm 1,79$)

Albero

Vigore *Medio*

Portamento *Espanso*

Densità Chioma *Media*

Lunghezza internodi *Medi*



Mignola

Moresca



Struttura infiorescenza *Compatta*

Lunghezza infiorescenza (mm) *Corta ($23 \pm 4,1$)*

Numero medio di fiori per mignola *Basso ($17,5 \pm 4,5$)*

Aborto dell'ovario *Basso*



Frutto

Peso (g) *Medio-alto ($4,3 \pm 0,9$)*

Lunghezza polare (cm) *$2,4 \pm 0,2$*

Larghezza trasv. max (cm) *$1,7 \pm 0,15$*

Forma *Ellittica ($1,43 \pm 0,11$)*

Simmetria frutto *Leggerm. asimmetrico*

Posizione diametro max *Centrale*

Forma apice *Arrotondato*

Forma base *Arrotondata*

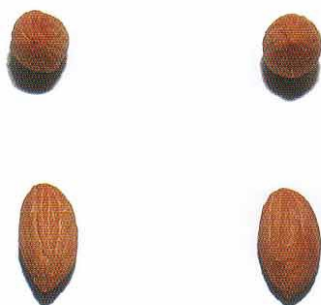
Umbone *Presente*

Presenza di lenticelle
(nel frutto verde) *Abbondante*

Dimensioni delle lenticelle *Grandi*

Progressione invaiatura *Dalla base*



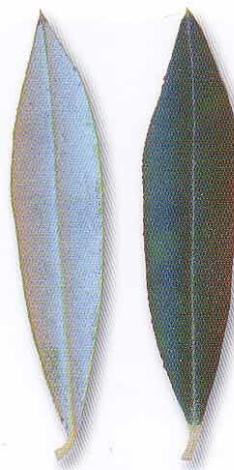


Endocarpo

Peso (g) *Grande* ($0,66 \pm 0,2$)
Lunghezza (cm) $1,66 \pm 0,20$
Larghezza max (cm) $0,81 \pm 0,11$
Forma *Ellittica* ($2,0 \pm 0,19$)
Simmetria nocciolo *Leggermente asimmetrico*
Posizione diametro max *Centrale*
Rilievo superficie *Rugosa*
Numero solchi fibrovascolari *Medio*
Distribuzione solchi fibrovascolari *Non uniforme*
Andamento solchi fibrovascolari *Irregolare*
Rilievo linea di sutura *Evidente*
Forma sezione trasversale max *Circolare*
Forma apice *Arrotondato*
Forma base *Arrotondata*
Mucrone *Assente*

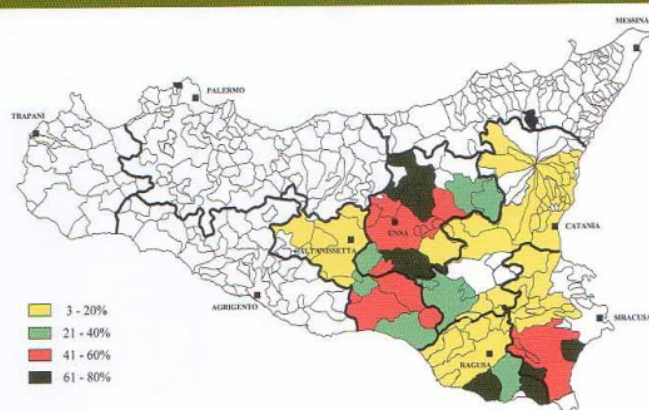
Foglia

Lunghezza (cm) *Media* ($5,3 \pm 0,6$)
Larghezza (cm) *Larga* ($1,50 \pm 0,20$)
Forma *Ellittica* ($3,6 \pm 0,5$)
Curvatura longitudinale lamina *Iponastica*
Angolo apice *Molto acuto*
Angolo base *Acuto*
Posizione larghezza max *Centrale*
Superficie lamina (cm²) *Media* ($4,3 \pm 0,79$)
Colore pagina superiore *Verde-grigio*
Colore pagina inferiore *Grigio-cinereo*





Moresca



N.B. LE PERCENTUALI INDICATE SONO RIFERITE ALL'INCIDENZA DELLA CULTIVAR SUL COMPLESSIVO PATRIMONIO VARIETALE DI OGNI SINGOLA AREA COMUNALE

APPENDICE III

Moresca e relativi mutanti somatici

